

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年1 月15 日 (15.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/004771 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 45/00, 38/17,  
39/395, 31/7088, A61P 31/00, 35/00, 35/04, 37/04, C12N  
5/10, C12Q 1/02, G01N 33/50, A61K 6/027(SHIBAYAMA,Shiro) [JP/JP]; 〒300-4247 茨城県 つく  
ば市 和台 1 7 番地 2 小野薬品工業株式会社内 Ibaraki  
(JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008420

(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE,Kunihisa); 〒103-0013 東京  
都 中央区 日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビ  
ル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年7 月2 日 (02.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-194491 2002 年7 月3 日 (03.07.2002) JP  
特願2003-29846 2003 年2 月6 日 (06.02.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野  
薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒541-8526 大阪府 大阪市 中央区道修  
町 2 丁目 1 番 5 号 Osaka (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) 出願人 および  
(72) 発明者: 本底 佑 (HONJO,Tasuku) [JP/JP]; 〒606-0001  
京都府 京都市 左京区岩倉大鷲町 1 9-4 Kyoto (JP).添付公開書類:  
— 国際調査報告書(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 湊 長博 (MI-  
NATO,Nagahiro) [JP/JP]; 〒606-8105 京都府 京都市  
左京区高野上竹屋町 1 0-3 6 Kyoto (JP). 岩井 佳  
子 (Iwai,Yoshiko) [JP/JP]; 〒602-0855 京都府 京都市  
上京区上生洲町 2 0 1-4 0 3 Kyoto (JP). 柴山 史朗2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMMUNOPOTENTIATING COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: 免疫賦活組成物

(57) Abstract: Compositions for treating cancer or infectious diseases mediated by immunopotential which is caused by inhibit-  
ing a immunosuppressive signal induced by PD-1, PD-L1 or PD-L2; a therapeutic method using the same; methods of screening an  
immunopotential, an anticancer substance or a substance against infectious diseases contained in these compositions as the active  
ingredient; a cell line to be used in these screening methods; a method of evaluating an anticancer agent; and a mammal having cancer  
cells transplanted therein which is to be used in the evaluation. The above compositions inhibiting the function of PD-1, PD-L1 or  
PD-L2 are useful in treating cancer or infectious diseases.(57) 要約: PD-1、PD-L1またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害した結果惹起される免疫賦活を介  
した癌の治療若しくは感染症の治療のための組成物およびそれらを用いた治療方法、その有効成分として含まれる  
免疫賦活物質、癌治療物質若しくは感染症治療物質のスクリーニング方法、それらスクリーニング方法に使用さ  
れる細胞株、癌治療物質を選別する評価法、およびその評価に用いられる癌細胞移植哺乳動物に関する。PD-1、  
PD-L1、またはPD-L2の機能を阻害する本発明の組成物は、癌または感染症に対する治療に有用である。

WO 2004/004771 A1

## 明 細 書

## 免疫賦活組成物

## 5 技術分野

本発明は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害することを特徴とする免疫賦活、癌の治療若しくは感染症の治療のための組成物、およびそれらを用いる治療方法に関する。

- さらに詳しく言えば、PD-1、PD-L1、またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害した結果惹起される免疫賦活を介した癌の治療若しくは感染症の治療のための組成物、それらを用いる治療方法、その組成物に有効成分として含まれる免疫賦活物質、癌治療物質若しくは感染症治療物質のスクリーニング方法、それらスクリーニング方法に使用される細胞株、癌治療物質を選別する評価法、およびその評価に用いられる癌細胞移植哺乳動物に関する。

## 背景技術

- 免疫療法は、ほとんどの薬物療法において避け難い副作用が軽減され、極めて特異性の高い治療方法として期待されている。特に、癌治療や感染症治療における薬物療法が、患者に対して大きな負担を課す治療方法であるために、患者のQOL（クオリティ・オブ・ライフ）の回復が重要視されているが、免疫療法は、ヒトがもともと備え持っている免疫反応を外因的な方法によって賦活化させ、薬物投与による負担の一部を肩代わりさせることによって、患者のQOLを回復させる目的のもとに行なうことができる。
- 25 免疫の賦活化は、Tリンパ球細胞の免疫反応を活性化させる方法で行なうことができる。T細胞の活性化には、抗原レセプター（TCR）を介した刺

激だけでなく、共役刺激分子群（例えば、CD 28）を介した付加的な刺激誘導が必要であるといわれている。一方、最近、共役刺激分子群と相同的な構造を有する分子群、CTLA-4とPD-1が発見され、抗原レセプター（TCR）シグナルを抑制するシグナルを発していることが報告されている。

- 5 T細胞の活性化の方法として、この共役抑制分子の機能を抑制することも有効な1つの手段であると考えられている。

- PD-1は免疫グロブリンファミリーに属する55 kDのI型膜タンパクとしてクローニングされた（The EMBO Journal, 1992年, 第11巻, 第11号, p.3887~3895、特開平5-336973号公報、特開平7-291996号公報）。ヒトPD-1 cDNAは、EMBL/GenBank Acc. No. NM\_005018に示される塩基配列で構成され、マウスPD-1 cDNAは、Acc. No. X67914に示される塩基配列で構成され、それら発現は、胸腺細胞においてはCD4-CD8-からCD4+CD8+細胞に分化する際に認められる（International Immunology, 1996年, 第18巻, 第5号, p.773~780、Journal of Experimental Medicine, 2000年, 第191巻, 第5号, p.891~898）。また、末梢におけるPD-1の発現は、抗原レセプターからの刺激により活性化したT細胞、B細胞（International Immunology, 1996年, 第18巻, 第5号, p.765~772参照）または活性化マクロファージを含む骨髄細胞に認められることが報告されている。

- PD-1の細胞内領域には、ITIMモチーフ（Immunoreceptor Tyrosine - based Inhibitory Motif）があり、免疫反応に対する抑制ドメインと考えられている。さらに、PD-1欠損マウスが、糸球体腎炎、関節炎といったループス様自己免疫病（C57BL/6遺伝子背景の場合）（International Immunology, 1998年, 第10巻, 第10号, p.1563~1572、Immunity, 1999年, 第11巻, 第2号, p.141~151）や拡張性心筋症様疾患（BALB/c遺伝子背景の場合）（Science, 2001年, 第291巻, 第5502号, p.319~332）を発症することから、PD-1が自己免疫疾患発症、特に、末梢自己免疫寛容の制

御因子であることも示唆されている。

- PD-1のリガンドであるPD-L1（ヒトPD-L1 cDNAはEMBL / GenBank Acc. No. AF233516、マウスPD-L1 cDNAはNM\_021893で示される塩基配列で構成される。）は、活性化した単球や樹状細胞などのいわゆる
- 5 抗原提示細胞に発現している（Journal of Experimental Medicine, 2000年, 第19巻, 第7号, p.1027~1034）。これら細胞は、Tリンパ球細胞に対して、さまざまな免疫誘導シグナルを誘導する相互作用分子を提示しており、PD-L1は、PD-1による抑制シグナルを誘導する分子の1つである。PD-L1リガンド刺激は、PD-1を発現しているTリンパ球細胞の活性化（細胞増殖、各種サイトカイン産生誘導）を抑制することが示されている。さら
- 10 に、PD-L1の発現は、免疫担当細胞のみでなく、ある種の腫瘍細胞株（単球性白血病由来細胞株、肥満細胞種由来細胞株、肝癌由来細胞株、神経芽細胞種由来細胞株、乳癌由来各種細胞株）でも確認されている（Nature Immunology, 2001年, 第2巻, 第3号, p.261~267参照）。
- 15 PD-L2（ヒトPD-L2 cDNAはEMBL / GenBank Acc. No. NM\_025239、マウスPD-L2 cDNAはNM\_021896で示される塩基配列で構成される（Nature Immunology, 2001年, 第2巻, 第3号, p.261~267）。）は、PD-1の第2番目リガンドとして同定されたが、その発現と機能はPD-L1とほぼ同じであることが報告されている。
- 20 PD-1に代表される共役抑制分子からの抑制シグナルは、抗原レセプター（TCR）および共役刺激分子によるポジティブなシグナルを適性に制御するメカニズムによって、リンパ球発生または成熟過程での免疫寛容や自己抗原に対する異常な免疫反応を制御していると考えられている。また、ある種の腫瘍やウイルスは、直接的もしくは間接的なメカニズムによって、T細胞の活性化および増殖を遮断し、これら共役抑制分子を自らに対する宿主免疫反応を衰弱させるのに利用していると考えられている（Cell, 1992年, 第
- 25

71 卷, 第 7 号, p.1093~1102、Science, 1993 年, 第 259 卷, 第 5093 号, p.368 ~370 参照)。さらに、T細胞の機能障害に起因すると考えられている疾患の一部では、これら共役抑制分子の異常がT細胞の機能障害を起していると考えられている。

5

#### 発明の開示

本発明の課題は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2による抑制シグナルを阻害して、免疫賦活させる組成物およびこの機構を介した癌治療または感染症治療のための組成物の提供にある。

- 10 本発明者らは、癌治療または感染症治療における新たな標的として、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に注目し、PD-1、PD-L1、またはPD-L2による抑制シグナルを阻害する物質が、免疫機能の回復、さらには賦活機構を介して癌の増殖を阻害することを見出した。さらに、感染したウイルスの排除にPD-1シグナル、具体的にはPD-1とPD-L1
- 15 またはPD-1とPD-L2の相互作用が関与していることを見出した。これら事実に基いて、PD-1、PD-L1、またはPD-L2による抑制シグナルを阻害する物質が、癌または感染症に対して治療効果を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

- 20 1. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を含有してなる免疫賦活組成物、
2. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を含有してなる癌治療組成物、
3. 癌転移を抑制する組成物である前項2記載の癌治療組成物、
- 25 4. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を含有してなる感染症治療組成物、

5. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする前項 2 または 3 記載の癌治療組成物、
6. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする前項 4 記載の感染症治療組成物、
- 5 7. PD-1 と PD-L 1 若しくは PD-1 と PD-L 2 の相互作用阻害物質、PD-1 の細胞内シグナル阻害物質、および PD-1、PD-L 1 若しくは PD-L 2 の産生阻害物質から選択される一以上の免疫抑制シグナル阻害物質である前項 1 乃至 6 のいずれかに記載の組成物、
8. PD-1 抗体、PD-L 1 抗体、可溶化 PD-1、および可溶化 PD-L 1 から選択される一以上の PD-1 と PD-L 1 の相互作用阻害物質である前項 7 記載の組成物、
- 10 9. 国際受託番号 FERM BP-8392 で識別されるハイブリドーマが産生する抗ヒト PD-1 抗体、非ヒト抗体をヒト化させた抗 PD-1 抗体、および完全ヒト型抗ヒト PD-1 抗体から選択される PD-1 抗体である前項 8 記載の組成物、
- 15 10. 遺伝子改変により PD-1 発現が阻害されたリンパ球細胞が、免疫抑制シグナル阻害物質である前項 1 乃至 6 のいずれかに記載の組成物、
11. PD-1 と PD-L 1 若しくは PD-1 と PD-L 2 の相互作用阻害物質、PD-1 の細胞内シグナル阻害物質、または PD-1、PD-L 1 若しくは PD-L 2 の産生阻害物質が、タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、ポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、抗体若しくはそれらの誘導体、有機合成化合物、無機化合物、および天然物から選択される一以上の物質である前項 7 記載の組成物、
- 20 12. PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質を投与することからなる免疫賦活方法、
- 25 13. PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質

- 質を投与することからなる癌治療方法、
- 1 4. 癌転移を抑制する前項 1 3 記載の癌治療方法、
- 1 5. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を投与することからなる感染症治療方法、
- 5 1 6. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする前項 1 3 または 1 4 記載の癌治療方法、
- 1 7. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする前項 1 5 記載の感染症治療方法、
- 1 8. PD-1とPD-L1若しくはPD-1とPD-L2の相互作用阻害物質、PD-1の細胞内シグナル阻害物質、およびPD-1、PD-L1若しくはPD-L2の産生阻害物質から選択される一以上の免疫抑制シグナル阻害物質である前項 1 2 乃至 1 7 のいずれかに記載の方法、
- 10 1 9. PD-1抗体、PD-L1抗体、可溶化PD-1、および可溶化PD-L1から選択される一以上のPD-1とPD-L1の相互作用阻害物質である前項 1 8 記載の方法、
- 15 2 0. 国際受託番号 FERM BP-8392 で識別されるハイブリドーマが産生する抗ヒトPD-1抗体、非ヒト抗体をヒト化させたPD-1抗体、および完全ヒト型抗ヒトPD-1抗体から選択されるPD-1抗体である前項 1 9 記載の方法、
- 20 2 1. 遺伝子改変によりPD-1発現が阻害されたリンパ球細胞が、免疫抑制シグナル阻害物質である前項 1 2 乃至 1 7 のいずれかに記載の方法、
- 2 2. PD-1とPD-L1若しくはPD-1とPD-L2の相互作用阻害物質、PD-1の細胞内シグナル阻害物質、またはPD-1、PD-L1若しくはPD-L2の産生阻害物質が、タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、ポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、抗体若しくはそれらの誘導体、有機合成化合物、無機化合物、および天然物から選択される1つ
- 25

- 以上の物質である前項 1 8 記載の方法、
- 2 3. 免疫賦活組成物を製造するための PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質の使用、
- 2 4. 癌治療組成物を製造するための PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質の使用、
- 5 2 5. 癌治療組成物が、癌転移抑制組成物である前項 2 4 記載の物質の使用、
- 2 6. 感染症治療組成物を製造するための PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質の使用、
- 2 7. PD-L 1 または PD-L 2 を発現するように形質転換されたスクリーニング用癌細胞株、
- 10 2 8. 前項 2 7 記載の細胞、リンパ球細胞および被験物質を接触させて、前項 2 7 記載の細胞へのリンパ球細胞の免疫反応に対する被験物質の増強作用を評価することを特徴とする免疫賦活物質のスクリーニング方法、
- 2 9. 癌細胞である前項 2 7 記載の細胞、リンパ球細胞および被験物質を接
- 15 触させて、その癌細胞へのリンパ球細胞の免疫反応に対する被験物質の増強作用またはその腫瘍細胞の増殖に対する阻害作用を評価することを特徴とする癌治療物質のスクリーニング方法、
- 3 0. 病原体を感染させた前項 2 7 記載の細胞または PD-L 1 若しくは PD-L 2 を発現する細胞、リンパ球細胞および被験物質を接触させて、その
- 20 感染細胞へのリンパ球細胞の免疫反応に対する被験物質の増強作用または病原体増殖に対する阻害作用を評価することを特徴とする感染症治療物質のスクリーニング方法、
- 3 1. 前項 2 7 記載の癌細胞株を移植して作出した哺乳動物、
- 3 2. 前項 3 1 記載の哺乳動物に被験物質を投与し、被験物質による移植癌
- 25 細胞の増殖に対する抑制率またはその被移植哺乳動物の生存率を評価することを特徴とする癌治療物質の選別方法に関する。



本発明中のPD-1、PD-L1またはPD-L2は、それぞれマウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ブタ、サルまたはヒトを含む霊長類の哺乳動物を由来とするものを含む。好ましくは、ヒトPD-1、ヒトPD-L1およびヒトPD-L2である。

- 5 本発明中のPD-1、PD-L1、またはPD-L2による免疫抑制シグナルは、少なくともPD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2との相互作用、PD-1の細胞内シグナルから構成される。さらに、PD-1、PD-L1、またはPD-L2分子自身の産生もこれに含まれる。

- 本発明中のPD-1、PD-L1、またはPD-L2による免疫抑制シグナルは、PD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2との相互作用またはPD-1の細胞内シグナルの直接的あるいは間接的な阻害によって阻害される。これらの阻害活性を有する物質として、PD-1、PD-L1、またはPD-L2にそれぞれ選択的に結合する物質が挙げられる。好ましくは、例えば、タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、ポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、抗体若しくはそれら誘導体、有機合成化合物、無機化合物、または天然物が挙げられる。特に、特異性に優れた物質として、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に対する抗体が挙げられる。
- 10
- 15

また、当該免疫抑制シグナルは、PD-1、PD-L1、またはPD-L2分子自身の産生の阻害によっても阻害される。

- 20 PD-1、PD-L1、またはPD-L2に対する抗体は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2による免疫抑制シグナルを阻害するものであれば、ヒト由来抗体、マウス由来抗体、ラット由来抗体、ウサギ由来抗体またはヤギ由来抗体のいずれの抗体でもよく、さらにそれらのポリクローナル若しくはモノクローナル抗体、完全型若しくは短縮型（例えば、F(a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a bまたはF v断片）抗体、キメラ化抗体、ヒト化抗体または完全ヒト型抗体のいずれのものでもよい。
- 25

そのような抗体は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2の細胞外領域の部分タンパク質を抗原として、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。細胞外領域の部分タンパク質は、公知のタンパク質発現ならびに精製法によって調製することができる。

- 5 ポリクローナル抗体は、公知の方法によって製造することができる。例えば、抗原タンパク質あるいはそれとキャリアー蛋白質との混合物で、適当な動物に免疫を行ない、その免疫動物から抗原タンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。用いられる動物としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、モルモット
- 10 トが一般的に挙げられる。抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを抗原タンパク質と共に投与することができる。投与は、通常約2週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうのが一般的である。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された動物の血液、腹水などから採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体
- 15 価の測定は、ELISA法によって測定することができる。ポリクローナル抗体の分離精製は、例えば、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤を用いた精製法、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法などの免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。
- 20 抗体製剤としては、モノクローナル抗体あるいはその修飾体がより好ましい。

- モノクローナル抗体産生細胞の作製は、抗原で免疫された動物から抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞
- 25 と融合させることにより、継代培養可能なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製することにより行なうことができる。抗原タンパク質の投与は、

抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に行なう。投与には、抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与するのが一般的である。また、“DNA免疫”と呼ばれる方法によっても、動物を免疫することができる。この方法は、免疫

5 動物の後足前脛骨筋にカルジオトキシン (Cardiotoxin) を処置し、さらに抗原タンパク質を発現するベクターを導入した後、組織修復の過程でベクターが筋細胞に取りこまれ、タンパク質を発現する現象を利用した方法である (Nature Immunology, 2001 年, 第 2 巻, 第 3 号, p.261~267)。

免疫される動物としては、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウサギまたは

10 モルモットが可能であるが、好ましくはマウスまたはラットが用いられる。融合操作は、コーラー (Kohler) とミルシュタイン (Milstein) の方法 (Nature, 1975 年, 第 256 巻, 第 5517 号, p.495~497) で実施することができ、融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが用いられる。骨髓腫細胞としては、P 3 U 1、NS 1、SP 2 / 0、AP

15 1 などの骨髓腫細胞が挙げられるが、通常 P 3 U 1 がよく利用される。モノクローナル抗体産生細胞の選別は、例えば、抗原タンパク質を直接あるいは担体と共に吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加することによる ELISA 法などにより検出して行なうことができる。さらに、ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、ELISA 法によって測定できる。モノクローナ

20 ル抗体の分離精製は、上記のポリクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。具体的には、国際受託番号 FERM BP-8392 で識別されるハイブリドーマが産生する抗ヒト PD-1 抗体あるいは国際受託番号 FERM BP-8396 で識別されるハイブリドーマが産生する抗マウス PD-L 1 抗体である。

25 国際受託番号 FERM BP-8392 で識別されるハイブリドーマは、2002 年 12 月 19 日付で日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号

305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号 FERM P-19162 で寄託され、2003 年 6 月 5 日付で国際寄託に移管されている。また、国際受託番号 FERM BP-8396 で識別されるハイブリドーマは、2002 年 6 月 25 日付で同センターに受託番号 FERM P-18908 で寄託され、2003 年 6 月 11 日付で国際寄託に移管されている。

抗体断片とは、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$  または  $s c F v$  抗体フラグメントであり、プロテアーゼ酵素により処理し、場合により還元して得ることができる。

$F(a b')_2$  抗体フラグメントは、精製されたモノクローナル抗体をペプシンで完全に消化し、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、プロテイン A あるいはプロテイン G カラムなどのアフィニティークロマトグラフィーのいずれかの方法により精製することができる。ペプシンの消化時間は、 $I g$  サブタイプにより異なるため、適当に調製することが必要である。 $F a b'$  抗体フラグメントは、調製した  $F(a b')_2$  を 2-メルカプトエチルアミンで部分還元することによって作製することができる。また、 $F a b$  抗体フラグメントは、システイン存在下で消化酵素パパインで直接消化し、精製して作製することができる。

また、モノクローナル抗体は、抗体のアミノ酸配列を決定したり、ハイブリドーマから単離できる抗体をコードする DNA 配列を利用して、遺伝子組換え技術により改変し、改変抗体やハイブリッド抗体を産生させることも可能である。例えば、通常の完全型抗体ではなく単鎖抗体として作製することもできる。 $s c F v$  抗体 (Single Chain Fv) は、ジョストらの方法 (Journal of Biological Chemistry, 1994 年, 第 269 巻, 第 42 号, p.26267~26273) により行なうことができる。重鎖および軽鎖の可変領域をそれぞれコードする DNA 断片を中性アミノ酸 (グリシンあるいはセリン) をコードするスペーサーで連結し、この融合 DNA を含む発現ベクターを適当な宿主細胞で発現させ

ることによって、本来の抗体の特性と親和性を保持する単鎖の抗体を作製することができる。

非ヒト抗体をヒトの治療に用いる場合、その抗体の抗原性を減少させることが不可欠である。患者の抗体に対する免疫反応は、有効な治療期間を短縮  
5 させる場合が多く、抗体をヒト化あるいは完全ヒト型化させ、抗体の抗原性を減らす工程が必要である。ヒトへの投与が可能となるよう改変されたヒト化抗体とは、同抗体をヒトに投与したときに薬理学的に許容し得る程度に、抗原性が減少あるいは血中動態が改善するよう改変された抗体である。

本発明の明細書中のヒトPD-1抗体またはヒトPD-L1抗体は、これ  
10 をヒト化あるいは完全ヒト型化した抗体をも含む。

ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物に免疫して作製された非ヒト抗体の一部をヒト抗体の一部に置換することによって作製できる。具体的には、ヒト抗体の定常領域をコードする遺伝子とのキメラを構築することによって作製  
15 できることが知られている (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1987 年, 第 84 巻, p.3439~3443, Journal of Immunology, 1987 年, 第 139 巻, 第 1 号, p.3521)。  
ヒトの定常領域のDNA配列は文献に記載されており、その定常領域遺伝子は既知のクローンから容易に入手できる。続いて、抗体の可変領域をコードするDNA配列をヒトの定常領域の配列に融合させる。ヒトの定常領域のアイソタイプは所望のエフェクター機能または抗体依存細胞性細胞毒性におけ  
20 る活性によって選択できる。好ましいアイソタイプはIgG1、IgG3およびIgG4である。また、ヒト軽鎖定常領域、 $\kappa$ 鎖または $\lambda$ 鎖のいずれも  
用いることができる。このヒト化キメラ抗体は通常の方法によって発現させることができる。

完全ヒト型抗体は、ヒト免疫グロブリンの定常領域遺伝子を導入されたマ  
25 ウス (ゼノマウス (Chemical Biology, 2000 年, 第 7 巻, 第 8 号, p.R185-6)、ヒューマブマウス (infection and immunity, 2002 年, 第 70 巻, 第 2 号, p.612-9)、

TCマウス (Biotechnology and Genetics Engineering Review, 2002 年, 第 19 巻, p.73~82)、KMマウス (Cloning Stem Cells, 2002 年, 第 4 巻, 第 1 号, p.91-102)) を利用して作製することができ、さらにそれらマウスから単離した抗体産生リンパ球をハイブリドーマにして、目的の抗体を量産させることができる。

- 5 また、ファージ・ディスプレイ法 (FEBS Letter, 1998 年, 第 441 巻, p.20-24) によっても作製することができる。この方法は、環状一本鎖DNAにヒト抗体遺伝子を組み込んだファージを利用して、ファージを構成する外殻タンパク質と融合した形で、ヒト型抗体をファージの表面に発現させることができる。
- 10 PD-1、PD-L1、またはPD-L2に結合するポリペプチドまたはその誘導体は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2のそれぞれの部分タンパク質であって、免疫抑制シグナルを誘導しないものが挙げられる。PD-1の免疫抑制シグナルの誘導には、PD-1が抗原レセプターの近傍に存在することが不可欠であり、そのためには抗原提示細胞、腫瘍あるいは癌
- 15 細胞に存在するPD-L1またはPD-L2との相互作用による拘束が必要である。したがって、細胞外ドメインのみであってPD-1と相互作用する部分を有する可溶化PD-L1または可溶化PD-L2は、PD-1の免疫抑制シグナルを阻害することができる。逆に、同様の構造を有し、PD-L1またはPD-L2に結合できる可溶化PD-1も、免疫抑制シグナルを阻
- 20 害することができる。これら可溶化タンパク質は、PD-1、PD-L1、またはPD-L2に結合するのに必要十分な細胞外領域を含むものであればよく、公知のタンパク質発現法および精製法によって調製することができる。

- PD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2の相互作用阻害物質がタンパク質またはポリペプチドであり、それらの相互作用に必須の領域が、
- 25 連続するポリペプチドのみによって構成されている場合、そのようなポリペプチド断片は、互いの拮抗物質になり得る。さらに、このポリペプチド断片

を化学的に修飾されたあるいはポリペプチド断片の立体構造をもとにコンピュータによって設計された分子群から、より強力な活性を有する拮抗物質を同定することが可能となる。また、相互作用領域のタンパク質立体構造解析データをもとにコンピュータによって設計された分子群の中から、最適の拮

5 抗分子をより効率的に選択することもできる。

また、PD-1とPD-L1またはPD-1とPD-L2のの相互作用を阻害する物質を直接スクリーニングすることができる。そのような物質は、タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、ポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、非ペプチド性化合物、有機合成化合物、または天然物（例  
10 えば、発酵生産物、細胞抽出物、植物抽出物、動物組織抽出物）のライブラリーから同定することが可能である。

PD-1細胞内ドメインの抑制シグナルは、PD-1細胞内ドメインであるITIMに結合した脱リン酸化酵素（例えば、SHP-1、2（Sathish JG, Journal of Immunology）, 2001年, 第166巻, 第3号, p.1763-70）が、抗原受  
15 容体複合体の細胞内複合体に接触することによって生じることから、総じて抗原受容体複合体とPD-1の接触の阻害によって阻害される。抑制シグナルを阻害する物質として、ITIMのチロシン残基のリン酸化を阻害する物質、ITIMへの脱リン酸化酵素の結合を阻害する物質、その脱リン酸化酵素の活性を直接阻害する物質などが挙げられる。抗原受容体複合体としては、  
20 T細胞受容体複合体、B細胞受容体複合体が挙げられる。

PD-1、PD-L1、またはPD-L2の産生は、特定のポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、有機合成化合物、無機化合物、または天然物などによって阻害できる。特に、好適なポリヌクレオチドまたはポリヌクレオシドとして、リボザイムと呼ばれるアンチセンスヌクレオチド誘導体が  
25 挙げられる。これは、PD-1、PD-L1または、PD-L2のmRNAに相補的なポリヌクレオチド誘導体を、対象の発現細胞に導入することによ

って、発現する mRNA が破壊される機構を利用したものである。さらに、ベクターは、患者から採取したリンパ球前駆細胞に対して、PD-1 の発現を阻害するような遺伝子操作に使用でき、その操作された細胞は、増殖、分化、そして、活性化させて、再び患者に投与する細胞医療に利用することができる。特に、癌に対する免疫療法においては、リンパ球前駆細胞の成熟化および活性化の際に、標的細胞の特異抗原を添加することによって、標的細胞に特異的で、よりクローナルなリンパ球細胞を調製することができる。

本発明のスクリーニング法は、細胞機能を測定する方法で行なうことができる。同方法で使用される PD-L1 または PD-L2 を発現するように形質転換したスクリーニング用癌細胞株とは、PD-L1 または PD-L2 を発現するように構築された発現ベクターを公知の方法によって細胞に導入し、一過性あるいは安定的に形質転換された癌細胞株を含む。使用される癌細胞株としては、サル COS-1 細胞、COS-7 細胞、Vero、チャイニーズハムスター細胞 CHO（以下、CHO 細胞と略記する。）、dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO（以下、CHO (dhfr-) 細胞と略記する。）、マウス L 細胞、マウス AtT-20、マウスミエロマ細胞、ラット GH3、HEK293T 細胞、ヒト FL 細胞などが用いられる。特に、動物細胞を形質転換する場合には、例えば、「細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル」（秀潤社、1995 年、第 263）や「Virology」（1973 年、第 52 巻、第 456 号）に記載の方法に従って行なうことができる。

また、自然に PD-L1 または PD-L2 を発現する細胞を用いることもできる。そのような細胞として、白血球細胞、好ましくは単球、マクロファージ若しくは抗原提示細胞、上皮系細胞、腫瘍細胞、癌細胞またはそれらの細胞株などである。腫瘍細胞または癌細胞として使用できる細胞として、例えば、P38D1 細胞、P815 細胞、NB41A3 細胞、MDA-231 細胞、SKBR-3 細胞、MCF-7 細胞、BT474 細胞、J558L 細胞



胞、P 3 U 1細胞、P A I細胞、X 6 3細胞またはS P 2 / 0細胞を用いることができる。

- PD-L 1若しくはPD-L 2を自然に発現する細胞または強制的に発現させた細胞であって、病原体を感染させた細胞を用いることもできる。感染
- 5 させる病原体としては、ヒト肝炎ウイルス（B型肝炎、C型肝炎、A型肝炎）またはE型肝炎）、ヒトレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（H I V 1、H I V 2）、ヒトT細胞白血病ウイルス、ヒトTリンパ向性ウイルス（H T L V 1、H T L V 2）、単純ヘルペスウイルス1型若しくは2型、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、ヒ
- 10 トヘルペスウイルス6を含むヒトヘルペスウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、おたふくウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、重症急性呼吸器症候群（S A R S）を発症するウイルス、エボラウイルス、西ナイルウイルス、またはそれらを人為的に改変されたウイルスが挙げられる。
- 15 その他の病原体として、例えば、病原性原生動物（例えば、トリパノソーマ、マラリアおよびトキソプラズマ）、細菌（例えば、マイコバクテリウム、サルモネラおよびリステリア）、または真菌（例えば、カンジダ）が挙げられる。

- 本発明のスクリーニング法で使用されるリンパ球細胞としては、T細胞ま
- 20 たはB細胞であり、好ましくは、細胞傷害性Tリンパ球細胞（C T L）である。また、本発明のスクリーニング法におけるリンパ球細胞の免疫反応は、細胞傷害反応（例えば、腫瘍免疫反応）、混合リンパ球反応、サイトカイン、抗体、補体若しくはその他細胞表面抗原の産生、または細胞増殖が挙げられる。

- 25 本発明の免疫賦活または癌治療組成物の有効成分のスクリーニング法は、具体的には、細胞傷害性Tリンパ球の対象細胞に対する細胞傷害活性を測定

し、その活性に対する被験物質の効果を定量することによって行なうことができる。この方法は、PD-1を自然に発現する細胞傷害性Tリンパ球細胞（CTL）あるいは細胞株（例えば、2C細胞）および同系マウス由来であってPD-L1またはPD-L2を自然に発現するもしくは強制的に発現させた細胞の混合培養に対して、被験物質を添加することによる細胞傷害活性の回復あるいは増強を定量するものである。本法の特徴は、PD-L1またはPD-L2を発現していない細胞に対する細胞傷害活性に比べ、PD-L1またはPD-L2を発現している細胞に対する細胞傷害活性が低く、被験物質による細胞傷害活性の回復（上昇幅）をより明確に測定できるところにある。被験物質による細胞傷害性の回復は、本発明の特徴とするPD-L1またはPD-L2による細胞傷害性の抑制の阻害に相当するものとして評価することができる。さらに、被験物質による細胞毒性を任意に測定することがより望ましい。これに使用される細胞としては、自然にPD-L1またはPD-L2を発現する腫瘍細胞株または癌細胞株（Nature Immunology, 2001年、第2巻、第3号、p.261~267）、例えば、P38D1細胞、P815細胞、NB41A3細胞、MDA-231細胞、SKBR-3細胞、MCF-7細胞、BT474細胞、J558L細胞、P3U1細胞、PAI細胞、X63細胞、またはSP2/0細胞を用いることができるが、PD-L1またはPD-L2を安定的にあるいは一過的に発現するように形質転換させた腫瘍細胞株または癌細胞株も使用することができる。

一方、使用できる細胞傷害性リンパ球は、PD-1を発現しているものであって、対象とする細胞に対して同系の動物由来の細胞であることが好ましい。

本発明の感染症治療組成物の有効成分のスクリーニングは、PD-1を自然に発現する細胞傷害性Tリンパ球細胞（CTL）あるいは細胞株（例えば、2C細胞）、病原菌またはウイルスを感染させた同系由来のPD-L1また

はPD-L2を自然に発現するもしくは強制的に発現させた細胞の混合培養に対して、被験物質を添加することによるその感染細胞へのリンパ球細胞の免疫反応の増強作用または病原菌若しくはウイルスの増殖活性に対する阻害作用を定量するものである。

- 5 さらに、同様の原理を利用した評価法では、上記のPD-L1またはPD-L2を発現するように形質転換させたスクリーニング用癌細胞株または自然にPD-L1またはPD-L2を発現する細胞を、同系哺乳動物に移植して作出した哺乳動物を使用することができる。作出する工程としては、細胞を移植する工程、評価対象が適切となるまで同哺乳動物を飼育する工程が不可欠である。この評価法は、移植細胞の増殖、各種サイトカイン若しくは細胞表面抗原の産生量、特に、細胞が癌細胞の場合は、同細胞の増殖、浸潤若しくは転移の組織学的解析または被移植哺乳動物の生存率を評価することを特徴とする。細胞増殖は、腹水癌または血液癌の場合はその単位容量当りの癌細胞数、固形癌の場合はその大きさまたは摘出後の重量によって評価することができる。本法における被験物質による癌治療効果は、PD-L1またはPD-L2による細胞傷害性抑制の阻害に由来する効果に相当するものとして評価することができる。移植する癌細胞株は、インビトロでのスクリーニング法で利用できる癌細胞のいずれも使用できるが、移植哺乳動物と同系由来のもので、増殖性が良いものがより好ましい。哺乳動物としては、ヒトを除く霊長類、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、ブタ、サルが挙げられる。
- 10
- 15
- 20

#### 産業上の利用可能性

- 本発明者らは、癌細胞移植動物モデルへの投与によって、癌の増殖を顕著に抑制し個体の延命効果を発揮する物質として、PD-1、PD-L1の機能を阻害するそれぞれの特異的抗体（抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体）
- 25

を発明した。これら抗体は、PD-1を発現しているCTL（細胞傷害性Tリンパ球細胞）へのPD-L1リガンドの提示によって相対的に低下する細胞傷害活性を回復あるいは増強させる作用を示した（実施例1，第1図参照）。これは、CTLによる癌細胞に対する細胞傷害活性が、これら抗体の投与によって増強しうることを示唆するものである。さらに、抗PD-L1抗体の投与は、PD-L1を人為的に発現させた肥満細胞腫由来細胞株を移入した同系マウスを用いた癌細胞移植動物モデル（蛋白質・核酸・酵素、1981年、26巻、3号、p.208～224）において、癌細胞の増殖、浸潤および転移を抑制し、個体の延命効果を示した（第2図、第3図参照）。さらに、この抗体によるPD-L1機能の阻害による効果と同様の効果が、PD-1の機能あるいは産生を阻害することによって得られることが示唆された。これは、PD-1欠損マウスを用いた癌移入モデルでは、移入癌細胞の増殖が全く認められなかったからであり、PD-1の機能阻害あるいは産生阻害も有効な癌治療方法になることを示すものである（実施例5，第5図参照）。

15 実際には、癌細胞移植動物モデルにおいて、抗PD-1抗体の投与が移入癌細胞の肝臓への転移を有意に抑制することが証明されていた（実施例13参照）。

さらに、発明者らは、PD-1、PD-L1、またはPD-L2によって誘導される免疫抑制シグナルを阻害する物質が、感染症治療に有用であることを示した（実施例11，第15図，第16図参照）。

本発明者らが実験的に示したこれら結果は、PD-1抗体またはPD-L1抗体のみが既述の効果を呈することを示すものではなく、PD-1、PD-L1、またはPD-L2からの免疫抑制シグナルを阻害し得るいずれの物質もほぼ同様の効果を呈することを証明するものである。そのような効果を有する物質として、例えば、抗PD-L2抗体、可溶化PD-1、可溶化PD-L1、可溶化PD-L2、PD-1拮抗物質、PD-L1拮抗物質、P

D-L 2 拮抗物質、PD-1 と PD-L 1 若しくは PD-1 と PD-L 2 の相互作用を阻害する物質、PD-1 産生阻害物質、PD-L 1 産生阻害物質、PD-L 2 産生阻害物質、または PD-1 による細胞内抑制シグナル阻害物質が挙げられる。

- 5      本発明の癌治療組成物の投与によって、その効果が期待される癌または腫瘍として、例えば、癌腫、扁平上皮癌（例えば、子宮頸管、陰、結膜、膈肺、口腔、皮膚、膀胱、舌、喉頭、食道）、腺癌（例えば、前立腺、小腸、子宮内膜、子宮頸管、大腸、肺、膵、食道、直腸、子宮、胃、乳房、卵巣）が挙げられる。さらに、肉腫（例えば、筋原性肉腫）、白血病、神経腫、メラノーマ、リンパ腫も含まれる。

- 10      これら癌または腫瘍のうち、特に PD-L 1 または PD-L 2 を顕著に発現しているものに対してその効果が顕著である。PD-L 1 または PD-L 2 の発現を、外科的に切除した癌または腫瘍塊あるいは体外に採取した病変部をサンプルとする検査により同定でき、本発明の組成物の投与は、PD-L 1 または PD-L 2 を顕著に発現している腫瘍または癌を有する患者に対する外科的処置後の治療として、効率的で有効な方法となる。PD-L 1 または PD-L 2 の発現の同定は、例えば、PD-L 1 抗体若しくは PD-L 2 抗体を用いた免疫化学的方法、RT-PCR 法または DNA アレイ法によって検査することができる。

- 20      癌に対する化学療法および放射線療法は、リンパ球の増殖を激しく減少させるという副作用が不可避である。本発明の組成物の投与は、減少したリンパ球細胞を刺激、増殖させる効果を示すと共に、通常の化学療法に付随する激しい副作用を最小限に抑制することができる。また、放射線療法についても同様である。また、本発明の組成物との併用によって、化学療法剤の用量または照射放射線量を通常使用される用量あるいは照射量から大幅に減少させることができる。

本発明の癌治療組成物は、既存の化学療法剤と併用あるいは合剤化することができる。そのような化学療法剤として、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗癌性抗生物質、植物由来アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマターゼ阻害剤、  
5 P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、その他免疫療法剤またはその他の抗癌剤が挙げられる。さらに、患者のQOL回復のための癌治療補助剤である白血球（好中球）減少症治療薬、血小板減少症治療薬、制吐剤、癌性疼痛治療薬と併用あるいは合剤化ができる。

本発明の癌治療組成物は、その他の免疫賦活物質と併用あるいは合剤化することができる。そのような免疫賦活物質としては、例えば、各種サイトカインや腫瘍抗原などが挙げられる。免疫反応を刺激するサイトカインとしては、例えば、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、インターフェロナー  
10  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、IL-1、IL-2、IL-3、IL-12などが挙げられる。また、B7リガンド誘導体、抗CD3抗体および抗CD28抗体、抗CTL  
15 A-4抗体も免疫反応を高めることができる。

癌抗原の投与も、癌細胞に対するTリンパ球細胞の特異的免疫反応を高めることができ、本発明の癌治療組成物との併用によって、付加的あるいは相乗的な増強を与えることができる。癌抗原は、遺伝子が明らかなものについては精製タンパク質として、また不明なものについては、癌細胞自体の溶解  
20 物として調製することができる。

そのような癌抗原として、例えば、悪性黒色腫のMAGE-1、MAGE-3由来のHLA-A1およびHLA-A2拘束ペプチドやMART-1、gp100が挙げられる。また、乳癌や卵巣癌のHER2/neuペプチドや腺癌のMUC-1ペプチド、さらに、転移性癌のNY-ESO-1も挙げ  
25 ることができる。

ウイルスは、感染宿主の免疫防御から逃れるための1つの方法として、T

リンパ球細胞の共役抑制因子を利用していると考えられている（Journal Experimental Medicine, 2000 年, 第 191 巻, 第 11 号, p.1987~1997）。ウイルス感染は、このようなウイルスのエスケープ機能に一部起因しており、本発明の組成物の投与によって T リンパ球細胞のウイルスに対する免疫反応を高めることができると考えられる。

本発明の感染症治療組成物の投与は、例えば、ヒト肝炎ウイルス（B 型肝炎、C 型肝炎、A 型肝炎または E 型肝炎）、ヒトレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（H I V 1、H I V 2）、ヒト T 細胞白血病ウイルスまたはヒト T リンパ向性ウイルス（H T L V 1、H T L V 2）の感染治療に有効である。また、単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 を含むヒトヘルペスウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、おたふくウイルス、インフルエンザウイルスまたは風邪ウイルスとして挙げられるアデノウイルス、エンテロウイルス若しくはライノウイルス、重症急性呼吸器症候群（S A R S）を発症するウイルス、エボラウイルス、または西ナイルウイルスの感染治療にも有効であると考えられる。

その他の病原体として、例えば、病原性原生動物（例えば、トリパノソーマ、マラリアおよびトキソプラズマ）、細菌（例えば、マイコバクテリウム、サルモネラおよびリステリア）または真菌（例えば、カンジダ）による感染に対しても有効であると考えられる。

本発明の感染症治療組成物は、既存の抗 H I V 剤、抗ウイルス剤、抗生物質製剤、抗菌剤、内臓真菌症治療薬と併用あるいは合剤化することができる。

抗 H I V 剤として、例えば、逆転写酵素阻害剤（例えば、A Z T、d d I、3 T C、d 4 T）、プロテアーゼ阻害剤（例えば、メシル酸サキナビル、リトナビル、メシル酸ネルフィナビル、アンブレナビル、メシル酸デラビルジ

ン、サキナビル、ロピナビル／リトナビル)、またはCCR5受容体拮抗剤が挙げられる。抗ウイルス剤としては、例えば、抗ヘルペスウイルス剤、抗インフルエンザウイルス剤、インターフェロナー $\alpha$ および $\beta$ 、または各種免疫グロブリンが挙げられる。

- 5 本発明の感染症治療組成物は、ウイルスもしくは病原体のワクチンと併用あるいは共に製剤化することができる。そのようなワクチンとしては、例えば、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、日本脳炎ワクチン、BCGワクチン、3種混合ワクチン、おたふくワクチン、水痘ワクチン、インフルエンザワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、またはコレラワクチンが挙げ
- 10 られる。

本発明の組成物は、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

- 投与量は、本発明に用いる薬物により異なると同時に、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、経口投与の場合は、通常、
- 15 成人一人あたり、1回につき、 $1\mu\text{g}$ から $100\text{mg}$ の範囲で、1日1回から数回投与される。非経口投与の場合は、成人一人あたり、1回につき、 $0.1\text{ng}$ から $10\text{mg}$ の範囲で、1日1回から数回投与され、その非経口投与形態は、好ましくは、静脈内投与であり、1日1時間から24時間の範囲で静脈内に持続投与される。

- 20 もちろん前記したように、投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて投与の必要な場合もある。

本発明の組成物と他の薬剤の併用剤を投与する際には、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤および、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐

- 25 剤、吸入剤、経鼻剤等として用いられる。

経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆



粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。また錠剤には舌下錠、口腔内貼付錠、口腔内速崩壊錠などが含まれる。

- このような内服用固形剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質は
- 5 そのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常
- 10 法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。
- 15 舌下錠は公知の方法に準じて製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質に賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、コロイダルシリカ、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（デンプン、L-ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチル
- 20 セルロース、クロスカルメロースナトリウム、繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、膨潤剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カーボポール、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、キサンタンガム、グアーガム等）、膨潤補助剤（グルコース、フルクトース、マンニトール、キシ
- 25 リトール、エリスリトール、マルトース、トレハロース、リン酸塩、クエン酸塩、ケイ酸塩、グリシン、グルタミン酸、アルギニン等）安定剤、溶解補

- 助剤（ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グルタミン酸、アスパラギン酸等）、香味料（オレンジ、ストロベリー、ミント、レモン、バニラ等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよい、
- 5 また2以上の層で被覆していてもよい。また、必要に応じて常用される防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の添加物を加えることもできる。口腔内貼付錠は公知の方法に準じて製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質に賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、コロイダルシリカ、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（デンプン、L-ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、付着剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カーボポール、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルアルコール、キサントガム、グアーガム等）、付着補助剤（グルコース、フルクトース、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルトース、トレハロース、リン酸塩、クエン酸塩、ケイ酸塩、グリシン、グルタミン酸、アルギニン等）安定剤、溶解補助
- 10 剤（ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グルタミン酸、アスパラギン酸等）、香味料（オレンジ、ストロベリー、ミント、レモン、バニラ等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよい、
- 15 また2以上の層で被覆していてもよい。また、必要に応じて常用される防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の添加物を加えることもできる。
- 20
- 25

- 口腔内速崩壊錠は公知の方法に準じて製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質をそのまま、あるいは原末もしくは造粒原末粒子に適当なコーティング剤（エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アクリル酸メタクリル酸コポリマー等）、
- 5 可塑剤（ポリエチレングリコール、クエン酸トリエチル等）を用いて被覆を施した活性物質に賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、コロイダルシリカ、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（デンプン、L-ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシ
- 10 メチルセルロース、クロスカルメロースナトリウム、繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、分散補助剤（グルコース、フルクトース、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルトース、トレハロース、リン酸塩、クエン酸塩、ケイ酸塩、グリシン、グルタミン酸、アルギニン等）安定剤、溶解補助剤（ポリエチレングリコール、
- 15 プロピレングリコール、グルタミン酸、アスパラギン酸等）、香味料（オレンジ、ストロベリー、ミント、レモン、バニラ等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。また、必要に応じて常用される防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤
- 20 等の添加物を加えることもできる。

- 経口投与のための内服用液剤は、薬剂的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノール
- 25 またはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤

等を含有していてもよい。

非経口投与のための外用剤の剤形には、例えば、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、湿布剤、貼付剤、リニメント剤、噴霧剤、吸入剤、スプレー剤、エアゾル剤、点眼剤、および点鼻剤等が含まれる。これらはひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、公知の方法または通常使用されている処方により製造される。

軟膏剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に研和、または溶融させて調製される。軟膏基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、  
10 高級脂肪酸または高級脂肪酸エステル（アジピン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、アジピン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル、オレイン酸エステル等）、ロウ類（ミツロウ、鯨ロウ、セレスン等）、界面活性剤（ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル等）、高級アルコール（セタノール、ステアリルアルコール、セトステアリルアルコール等）、シリコン油  
15 （ジメチルポリシロキサン等）、炭化水素類（親水ワセリン、白色ワセリン、精製ラノリン、流動パラフィン等）、グリコール類（エチレングリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、マクロゴール等）、植物油（ヒマシ油、オリーブ油、ごま油、テレピン油等）、  
20 動物油（ミンク油、卵黄油、スクワラン、スクワレン等）、水、吸収促進剤、かぶれ防止剤から選ばれるもの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、保湿剤、保存剤、安定化剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでいてもよい。

ゲル剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、  
25 ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶融させて調製される。ゲル基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、低級アルコ

ール（エタノール、イソプロピルアルコール等）、ゲル化剤（カルボキシメ  
チルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロ  
ース、エチルセルロース等）、中和剤（トリエタノールアミン、ジイソプロ  
パノールアミン等）、界面活性剤（モノステアリン酸ポリエチレングリコー  
5 ル等）、ガム類、水、吸収促進剤、かぶれ防止剤から選ばれるもの単独また  
は2種以上を混合して用いられる。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を  
含んでいてもよい。

クリーム剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例え  
ば、ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解または乳化させて調製さ  
10 れる。クリーム基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。  
例えば、高級脂肪酸エステル、低級アルコール、炭化水素類、多価アルコー  
ル（プロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール等）、高級アルコ  
ール（2-ヘキシルデカノール、セタノール等）、乳化剤（ポリオキシエチ  
レンアルキルエーテル類、脂肪酸エステル類等）、水、吸収促進剤、かぶれ  
15 防止剤から選ばれるもの単独または2種以上を混合して用いられる。さらに、  
保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでいてもよい。

湿布剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、  
ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解させ、練合物とし支持体上に  
展延塗布して製造される。湿布基剤は公知あるいは通常使用されているもの  
20 から選ばれる。例えば、増粘剤（ポリアクリル酸、ポリビニルピロリドン、  
アラビアゴム、デンプン、ゼラチン、メチルセルロース等）、湿潤剤（尿素、  
グリセリン、プロピレングリコール等）、充填剤（カオリン、酸化亜鉛、タ  
ルク、カルシウム、マグネシウム等）、水、溶解補助剤、粘着付与剤、かぶ  
れ防止剤から選ばれるもの単独または2種以上を混合して用いられる。さら  
25 に、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでいてもよい。

貼付剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、

- ひとつまたはそれ以上の活性物質を基剤に溶解させ、支持体上に展延塗布して製造される。貼付剤用基剤は公知あるいは通常使用されているものから選ばれる。例えば、高分子基剤、油脂、高級脂肪酸、粘着付与剤、かぶれ防止剤から選ばれるもの単独または２種以上を混合して用いられる。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでもよい。

- リニメント剤は公知または通常使用されている処方により製造される。例えば、ひとつまたはそれ以上の活性物を水、アルコール（エタノール、ポリエチレングリコール等）、高級脂肪酸、グリセリン、セッケン、乳化剤、懸濁化剤等から選ばれるもの単独または２種以上に溶解、懸濁または乳化させて調製される。さらに、保存剤、抗酸化剤、着香剤等を含んでもよい。

噴霧剤、吸入剤、およびスプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。

- 非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート８０（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって製造される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

非経口投与のための吸入剤としては、エアロゾル剤、吸入用粉末剤又は吸

入用液剤が含まれ、当該吸入用液剤は用時に水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁させて使用する形態であってもよい。

これらの吸入剤は公知の方法に準じて製造される。

- 例えば、吸入用液剤の場合には、防腐剤（塩化ベンザルコニウム、パラベン等）、着色剤、緩衝化剤（リン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム等）、等張化剤（塩化ナトリウム、濃グリセリン等）、増粘剤（カリボキシビニルポリマー等）、吸収促進剤などを必要に応じて適宜選択して調製される。

- 吸入用粉末剤の場合には、滑沢剤（ステアリン酸およびその塩等）、結合剤（デンプン、デキストリン等）、賦形剤（乳糖、セルロース等）、着色剤、防腐剤（塩化ベンザルコニウム、パラベン等）、吸収促進剤などを必要に応じて適宜選択して調製される。

吸入用液剤を投与する際には通常噴霧器（アトマイザー、ネブライザー）が使用され、吸入用粉末剤を投与する際には通常粉末薬剤用吸入投与器が使用される。

- 15 非経口投与のためその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、常法により処方される直腸内投与のための坐剤および腔内投与のためのペッサリー等が含まれる。

- スプレー剤は、一般的に用いられる希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような緩衝剤、例えば塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムあるいはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば、米国特許第 2,868,691 号明細書および米国特許第 3,095,355 号明細書に詳しく記載されている。

#### 図面の簡単な説明

- 25 第 1 図（A）は、H-2L<sup>d</sup>特異的 2C CTL クローンの PD-1 発現と、P815（肥満細胞種由来細胞株）の PD-L1 発現安定形質転換株での PD

ーL 1 発現を示すフローサイトメトリー、(B) は、PD-L 1 発現 P 8 1 5 細胞株に対する 2C CTL 細胞株の細胞傷害活性と抗 PD-L 1 抗体 (anti-PD-L 1 F (a b')<sub>2</sub> I g G) の細胞傷害活性に対する効果を示す。

第 2 図は、同系マウスにおける移植 PD-L 1 発現 P 8 1 5 細胞株の腫瘍  
5 増殖性と浸潤性を示す。(A) は移植 PD-L 1 発現 P 8 1 5 腫瘍の腫瘍容積 (上)、移植後の生存率 (下) であり、(B) は同系 DBA/2 マウスにおける移植 PD-L 1 発現 P 8 1 5 腫瘍塊の組織染色像である (a は腹壁および腹膜への腫瘍細胞の浸潤を示す 40 倍像、b は同じく 400 倍像、c は脾臓への転移、d は肝臓への転移を示す。 )。

10 第 3 図は、同系マウスにおける移植 PD-L 1 発現 P 8 1 5 細胞株の腫瘍増殖性に対する抗 PD-L 1 抗体の in vivo 効果を示す。(A) は当該マウスにおける腫瘍特異的 CD 8 + T 細胞からの IFN- $\gamma$  産生に対する抗 PD-L 1 抗体の in vivo 効果、(B) は当該マウスにおける移植 PD-L 1 発現 P 8 1 5 腫瘍の腫瘍容積 (上) と生存率 (下) に対する抗 PD-L 1 抗体の in vivo  
15 効果を示す (図中、□ は対照群 (ラット I g G 投与群)、○ は抗 PD-L 1 抗体 (anti-PD-L 1 F (a b')<sub>2</sub> I g G) 投与群)。

第 4 図は、PD-1 遺伝子ホモ欠損同系マウス (PD-1<sup>-/-</sup>) での PD-L 1 発現 B 1 6 メラノーマの増殖抑制を示す。

第 5 図は、同系マウス (BALB/c) における移植ミエローマ細胞株の  
20 腫瘍増殖性に対する抗 PD-L 1 抗体の in vivo 効果と PD-1 の関与を示す。

(A) は各種ミエローマ細胞株での PD-L 1 発現を示すフローサイトメトリー、(B) は前記マウスにおける移植 J 5 5 8 L 腫瘍の腫瘍容積に対する抗 PD-L 1 抗体の in vivo 効果、(C) は野生型および PD-1 遺伝子欠損 PD-1<sup>-/-</sup> の同系マウスにおける移植 J 5 5 8 L 腫瘍の腫瘍増殖の比較を示  
25 す。

第 6 図は、血管内皮での PD-L 1 発現を示す。(A) はマウス心臓の血



管内皮細胞でのPD-L1, PD-L2の発現を示す。(B)はマウス各組織でのPD-L1発現の確認を組織染色を示す。(a):眼球、(b):顎下腺、(c):心臓、(d):肺、(e):肝臓、(f):腎臓でのPD-L1の発現を示す。図中、Chは脈絡膜、CVは中心静脈、Glは糸球体、  
5 Reは網膜を示す。各矢印は、血管内皮細胞を示す。各染色像は40倍拡大像である。

第7図は、肝臓非実質細胞でのPD-L1発現を示す。(A)はマウス肝臓でのICAM-1、(B)はPD-L1の発現を示す(CV:中心静脈)。

第8図は、クップファー細胞(Kupffer Cell)および肝臓類洞周囲腔内皮細胞(LSEC)での細胞表面分子のフェノタイプを示す。  
10

第9図は、PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)のCD4陽性T細胞での細胞表面分子のフェノタイプを示す。

第10図は、PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)のCD8陽性T細胞での細胞表面分子のフェノタイプを示す。

15 第11図は、T細胞増殖に対するLNPCのPD-L1の効果を示す。

(A)はPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスのそれぞれのナイーブT細胞刺激時の細胞増殖を示す。(B)はPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウス由来で既に活性化されたT細胞とLNPCとの共培養における細胞増殖に対する抗PD-L1抗体の効果を示す。

20 第12図は、サイトカイン産生に対するLNPCのPD-L1の効果を示す。(A)はPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスのそれぞれのナイーブT細胞刺激時のサイトカイン産生を示す。(B)は、PD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウス由来で既に活性化されたT細胞とLNPCとの共培養におけるサイトカイン産生に対する抗PD-L1抗体の効果を示す。(C)はLNPCとの共  
25 培養におけるPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびwtマウスからの活性化T細胞の細胞分裂を示す。

- 第13図は、ウイルス感染したマウス肝臓におけるTリンパ球細胞の増殖に対するPD-1の関与を示す。(A)はアデノウイルス感染後0日目、(B)は同7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびw tマウスの肝臓および脾臓でのCD19陽性およびCD3陽性リンパ球細胞の増殖を示す。
- 5 第14図は、ウイルス感染したマウス肝臓におけるTリンパ球細胞の増殖に対するPD-1の関与を示す。(A)はアデノウイルス感染後7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびw tマウスの肝臓でのCD4陽性およびCD8陽性リンパ球細胞の増殖を示す。(B)は、感染後7日目での各種増殖性リンパ球の割合を示す。
- 10 第15図は、ウイルス感染に対するPD-1の関与を示す。図中(a)～(d)は、アデノウイルス感染後0日および7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびw tマウスの肝臓でのそれぞれの細胞増殖を示す組織染色像である。(e)、(f)はアデノウイルス感染後7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスでのCD4陽性、CD8陽性T細胞の細胞増殖を示す。
- 15 第16図は、ウイルス感染に対するPD-1の関与を示す。図中(g)～(n)は、アデノウイルス感染後0日および7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびw tマウスの肝臓のヘマトキシリン&エオジン組織染色像である。図中(o)～(r)は、アデノウイルス感染後0日および7日目でのPD-1<sup>-/-</sup>マウスおよびw tマウスの肝臓のX-Gal染色像である。
- 20 第17図は、細胞傷害活性に対する各物質の増強作用を示す。図中(a)抗マウスPD-1抗体の増強作用、(b)抗マウスPD-L1抗体の増強作用、(c)マウスPD-1Fcの増強作用(d)ヒトPD-1Fcの増強作用を示す。
- 25 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明を、より具体的に説明するが、これらは本発

明の範囲を制限するものではない。

### 実施例 1

マウス PD-L1 発現ベクターの作製は、マウス PD-L1cDNA (Journal of  
5 Experimental Medicine, 2000 年, 第 19 巻, 第 7 号, p.1027~1034) を制限酵素  
EcoRI で消化して、発現ベクター pApuroXS (The EMBO Journal, 1994 年, 第  
13 巻, 第 6 号, p.1341~1349) に挿入し、連結させることによって行った。  
作製した発現ベクター pApuroXS-PD-L1 の P815 細胞への導入は、エレクト  
ロポレーション法 (360V、500 $\mu$ F) で行った。P815 細胞の培  
10 養は、FCS (10%)、2-メルカプトエタノール ( $10^{-5}$ M)、各種抗  
生物質含 RPMI-1640 培地で培養できるが、さらに、抗生物質ピューロマイシ  
ン (Puromycin; 3 $\mu$ g/ml) を含んだ培地の培養に対して耐性の同細胞株  
を継代培養することによって、マウス PD-L1 を安定的に発現する形質転  
換 P815 細胞株を取得した。PD-L1 の発現は、フローサイトメトリー  
15 解析にて確認した。第 1 図 (A) に H-2L<sup>d</sup> 特異的 2C CTL クローンの PD  
-1 発現 (i) と、P815 (肥満細胞種由来細胞株) の PD-L1 発現安  
定形質転換株での PD-L1 発現 (ii) を示すフローサイトメトリーを示す。

同様の方法で、PD-L1 を安定的に発現する形質転換 B16 細胞株 (B  
16/PD-L1) を取得した (第 1 図 (A) (iii) ~ (v) 参照)。ここで  
20 は発現ベクターとして同様の方法で作製した pEFBOSneo-PD-L1 (Nucleic Acid  
Research, 1990 年, 第 18 巻, 第 17 号, p.5322) を用い、細胞株の選択培養に  
は G418 (0.5mg/ml) を使用した。

全長マウス PD-L1cDNA の 3'末端側に 6 個のヒスチジンがタンデムに並ん  
だペプチドタグ (His-Tag) を連結させたタンパク質をコードする cDNA を  
25 制限酵素 EcoRI および NotI で消化して、発現ベクター pVL1393 (商品名:  
Clontech より購入) に挿入させた。続いて、この発現ベクターを SF9 昆虫細

胞 (Invitrogen より購入) に導入して、封入体を回収した。この封入体ウイルスを HiFive 昆虫細胞 (Invitrogen より購入) に 2 日間、27℃ 下で培養することによって感染させた。溶解緩衝液 (Tris-HCl (50 mM, pH 7, 含 1% TritonX-100)、EDTA (10 mM)、NaCl (150 mM)、各種プロ  
5 テアーゼ阻害剤) で溶解させた細胞溶解液を、Ni-セファロースカラムクロマトグラフィーで処理することによって、抗原となる精製 PD-L1 タンパク質を取得した。

透析した同 PD-L1 タンパク質を完全フロイントアジュバンドと共に 8 週令メス Whister ラット (SLC Japan より購入) に免疫して、数日後、末梢リンパ節から回収した  $2 \times 10^8$  細胞を、PEG1500 (Amersham より購入) を用いて同数の SP2/O 細胞と細胞融合させた。さらに、RPMI1640 培地 (HAT (Sigma より購入)、Origen (10%, Igen より購入)、FCS (10%)、  
10 2-メルカプトエタノール ( $10^{-5}$  M)、各種抗生物質) で培養することによって選択し、産生抗体の存在をフローサイトメトリー解析にて確認した。  
15 これによって樹立されたハイブリドーマ (国際受託番号: FERM BP-8396 で認識されるハイブリドーマ) を Balb/C nu/nu マウスに移入して、後に腹水からの回収液をプロテイン G セファロースカラムクロマトグラフィーで精製することによって、PD-L1 に対するモノクローナル抗体 (1-111) を取得した。フローサイトメトリー等で使用される抗体は、Sulfo-NHS-LC-biotin (商  
20 品名: Pierce より購入) を用いてビオチン化したものを用いた。

また、同様の方法に従い、抗ヒト PD-1 抗体 (国際受託番号: FERM BP-8392 で認識されるハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体) を作製した。

細胞傷害性アッセイは、 $^{51}\text{Cr}$  (クロム) 遊離アッセイによって行った。  
25 2C 細胞 (Journal of Immunology, 1996 年, 第 157 巻, 第 2 号, p.670~678) は、2C トランスジェニック B6 マウス由来の (H-2L) <sup>d</sup> アロ反応性の細

胞傷害性T細胞である。第1図(B)に、2C細胞(E:エフェクター)を<sup>5</sup>  
<sup>1</sup>C rラベル化したP815細胞(T:ターゲット)と共に(○)または3つ  
のPD-L1発現P815細胞株(P815/PD-L1)(□、◇、△)  
と共にあるいはさらに10mg/mlラット anti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>IgG 存在下(▲)  
5 を、さまざまなE/T比で混合して、4時間で遊離される<sup>51</sup>C rを測定した  
結果を示す。

抗PD-L1抗体(anti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>)は、細胞傷害性Tリンパ球細胞の低  
下した細胞傷害活性を回復させた。これらの結果から、PD-L1の機能を  
阻害することによるPD-1およびPD-L1シグナルの阻害は、癌細胞に  
10 対する細胞傷害活性を増強させることができると考えられる。

## 実施例2

1 × 10<sup>6</sup>細胞のP815細胞(n=6)またはP815/PD-L1細胞  
(n=6)を同系DBA/2マウスの皮下にそれぞれ移入し、腫瘍増殖とマ  
15 ウスの生存率を評価した。その結果を第2図(A)に示す。図中、○はP8  
15細胞株移植群、□、△はPD-L1発現P815細胞株移植群である。  
さらにP815/PD-L1細胞を移入した群の組織学的解析を行った。移  
入20日後のマウスの腹壁ならびに腹膜腔の組織切片を、10%ホルムアル  
デヒドで固定、パラフィンで砲架して、ヘマトキシリン、エオジンで染色し  
20 て得られた染色像を第2図(B)に示す。図中、aは腹壁および腹膜への腫  
瘍細胞の浸潤を示す40倍像、bは同じく400倍像であり、cは脾臓への  
転移、dは肝臓への転移を示す。

P815細胞を移植した群では、P815細胞の増殖は抑えられており、  
6~7週目では30%が生存したのに対して、PD-L1を発現するP81  
25 5細胞(P815/PD-L1)を移植した群では、癌細胞の増殖は著しく、  
2~4週目までに全例が死亡した(第2図(A))。P815/PD-L1

は、腹膜腔、さらに、腹腔へ浸潤しており、また、肝および脾臓への転移が認められた（第2図（B） a～d 参照）。

### 実施例 3

- 5 P 8 1 5 細胞を移入し免疫したマウスから細胞傷害性 T 細胞 C T L を調整し、 $2 \times 10^6$  個数の C T L 細胞と、 $5 \times 10^6$  個数の P 8 1 5 細胞または P 8 1 5 / P D - L 1 細胞のみ、あるいは anti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>IgG (10 mg / ml) 存在下で P 8 1 5 / P D - L 1 細胞をそれぞれ混合培養し、24 時間後の培養上清中の I F N -  $\gamma$  を E L I S A キット (Bioscience から購入) で測定  
10 した。その結果を第3図（A）に示す。

- また、第3図（B）に、 $3 \times 10^6$  個数の P 8 1 5 / P D - L 1 細胞を皮下移入した同系 D B A / 2 マウス (n = 10) に、ラット I g G (□) あるいは anti-PD-L1F(ab')<sub>2</sub>IgG (0.1 mg / 一匹) (○) を、細胞移入後 1、3、5、7 日後にそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍増殖とマウスの生存率を評価した結果  
15 を示す。

- 抗 P D - L 1 抗体は、P 8 1 5 / P D - L 1 により抑制された細胞傷害性 T リンパ球細胞からの I F N -  $\gamma$  産生を回復させた（第3図（A））。抗 P D - L 1 抗体の投与は、癌細胞増殖を抑制し、明確な生存効果を示した（第3図（B））。この結果は、抗 P D - L 1 抗体の投与が癌治療に有効であることを示している。  
20

### 実施例 4

- $1 \times 10^6$  個数の B 1 6 メラノーマ (n = 6) または B 1 6 / P D - L 1 細胞 (n = 6) を B 6 マウスにはそれぞれ皮下移入し、同数の B 1 6 / P D -  
25 L 1 細胞を P D - 1 トランスジェニック B 6 マウス (n = 5) および P D - 1 遺伝子ホモ欠損 B 6 マウス (P D - 1<sup>-/-</sup> (n = 4)) (Science, 2001 年,

291 巻, 5502 号, p.319~332) に移入し、以後 25 日までそれぞれの腫瘍増殖を測定した。その結果を第 4 図に示す。

#### 実施例 5

- 5      $2.5 \times 10^8$  個数の J 5 5 8 L ミエローマ細胞を皮下移入した同系 B a l b / C マウス (n = 9) に、ラット I g G あるいは anti-PD-L1F(ab)<sub>2</sub>IgG (0.1 mg / 一匹) を細胞移入後 3、5、7 日後にそれぞれ腹腔内投与し、腫瘍増殖を評価した (第 5 図 (B))。また、同様に J 5 5 8 L ミエローマ細胞を皮下移入した PD-1 ホモ欠損マウスと B a l b / C (n = 4) での腫瘍増殖
- 10    を比較した (第 5 図 (C))。

- 抗 PD-L1 抗体の投与は、PD-L1 を発現している J 5 5 8 癌細胞 (第 5 図 (A) に各種ミエローマ細胞株での PD-L1 発現を示すフローサイトメトリーを示す。) の増殖を抑制した (第 5 図 (B))。また、J 5 5 8 細胞を移植した PD-1 欠損マウスでは移植癌細胞の増殖は完全に阻害された
- 15    (第 5 図 (C))。これらの結果は、PD-L1 もしくは PD-1 の阻害が癌治療に有効であることを示している。

#### 実施例 6

- 血管内皮細胞 (以下、E C s と略す。) をマレリーバーグの方法 (Journal
- 20    Immunology Methods, 2000 年, 第 244 巻, 第 1-2 号, p.205~215) により、マウス心臓から取得した。具体的には、心臓組織をコラゲナーゼで消化した後、マウス I g とともに前培養、さらに、F I T C 修飾した抗 C D 3 1 抗体、同修飾抗 C D 1 0 5 抗体、同修飾抗 isolectinB4 抗体、および、抗 F I T C ビーズを添加して培養した。この血管内皮細胞を Magnetic-activated cell-sorting
- 25    separation columns (商品名 : Miltenyi Biotec より購入) を用いて、ポジティブ選択によって精製した。

取得した血管内皮細胞でのPD-L1、PD-L2の発現を、フローサイトメトリーで確認した。同細胞の標識には、抗PD-L1抗体（抗体名：1-111）、抗PD-L2抗体（抗体名：#122）および蛍光標識した2次抗体を用いて行った（第6図（A））。解析はCellQuestソフトウェア（Dickinsonより購入）を使用したFacsCalibur（機器名：Becton Dickinsonより購入）で、1万回イベントで解析した。PD-L1あるいはPD-L2の発現は、開口曲線で示され、コントロールIgは充填曲線で示される。

マウス各組織でのPD-L1発現の確認を組織染色によって行った。各組織サンプリング1時間前に100 $\mu$ gビオチン標識化抗PD-L1抗体（1-111）を溶解した100 $\mu$ l PBSをマウスに静脈投与した。続いて、5 $\mu$ m凍結切片を4%パラホルムアルデヒド（PFA）で固定して、Streptavidin-FITCで染色した。さらに、各切片をPhalloidinで対比染色した（第6図（B）、（a）眼球、（b）顎下腺、（c）心臓、（d）肺、（e）肝臓、（f）腎臓でのPD-L1の発現を示す。図中、Chは脈絡膜、CVは中心静脈、Glは糸球体、Reは網膜を示す。各矢印は、血管内皮細胞を示す。各染色像は40倍拡大像である。）。PD-L1は、心臓、肺、腎臓、胃、小腸、顎下腺、眼球、肝臓の血管内皮で認められた。肝臓での発現は、肝臓洞様毛細血管に局在していた。

## 20 実施例7

肝臓非実質細胞（以下、LNPCsと略記する。）でのPD-L1発現を組織染色（第7図（A））ならびにフローサイトメトリー（第7図（B））で確認した。組織染色は、3%PFAで固定した5 $\mu$ m肝臓凍結切片をラット血清で前処理し、ビオチン標識化抗PD-L1抗体（1-111）あるいはビオチン標識化抗ICAM-1抗体（商品名：BD Pharmingenより購入）にて1時間、室温下で抗体反応を行ない、ビオチン抗体を tyramide signal



amplification (TSA) fluorescence system (機器名: PerkinElmer Life Sciences より購入) にて視覚化した (第7図 (A): ICAM-1 の発現、同図 (B): PD-L1 の発現、CV: 中心静脈を示す。各染色像は40倍拡大像である。)

LNPCs は、pronaseE 法 (Experimental Cell Research, 1976 年, 第99巻, p.444~449) によってマウス肝臓より単離した。具体的には、LNPCs は、肝臓を pronaseE 溶液 (Merck) にて還流、培養し、密度勾配遠心法にて分離した。その細胞懸濁液中のクップファー細胞 (Kupffer Cells) ( $CD54^+$ 、 $CD11b^{high}$ ) の相対的分布は20~25%であり、肝臓類洞周囲腔内皮細胞 (以下、LSECs と略記する。) ( $CD54^+$ 、 $CD11b^{high}$ ) は、75~80%である。

クップファー細胞とLSECs を、FITC標識化抗CD11b抗体およびICAM-1、PD-L1、B7-1、B7-2に対するそれぞれのビオチン化モノクローナル抗体、それに続くPE標識化 Streptavidin にて、それぞれ二重染色した。クップファー細胞とLSECs は、それぞれ $CD11b^{high}$  と $CD11b^{low}$ 細胞としてゲートされる (第8図)。

PD-L1 は、クップファー細胞では、ICAM-1、B7-1、B7-2 を共発現しているが、LSECs ではその発現は弱いものであった (第8図)。

## 20 実施例 8

PD-1 遺伝子ホモ欠損マウス (PD-1<sup>-/-</sup>) あるいは野生型C57BL/6 マウス (wt) の脾臓ならびにリンパ組織から、T-cell enrichment column (商品名: Genzyme より購入) を用いたネガティブ選別によって、ナイーブT細胞 (精製度90%以上) を精製した。同細胞を $10 \mu g/ml$  抗CD3モノクローナル抗体 (2C11) とともに48時間培養して活性化させた。

上記方法によって活性化したナイーブT細胞を、FITC標識化抗CD4

抗体あるいはA P C標識化抗C D 8抗体ならびにP E標識化抗C D 2 5抗体、  
P E標識化抗C D 4 4抗体、P E標識化抗C D 6 9抗体、P E標識化抗C T  
L A-4抗体、ビオチン標識化抗B 7-1 (C D 8 0)抗体、ビオチン標識  
5 化抗B 7-2 (C D 8 6)抗体、抗P D-1抗体(抗体名: J 4 3、国際受  
託番号 FERM BP-8118 で認識されるハイブリドーマから産生されるモノクロ  
ーナル抗体)、抗P D-L 1抗体(1-1 1 1)で二重染色して、フローサ  
イトメトリーにてそれぞれの分子の発現を解析した(第9図、第10図)。

なお、国際受託番号 FERM BP-8118 で識別されるハイブリドーマは、2001  
年5月30日付で日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番  
10 号 305-8566)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受  
託番号 FERMP-18356 で寄託され、2002年7月16日付で国際寄託に移管され  
ている。

#### 実施例9

15 P D-1遺伝子ホモ欠損マウス(P D-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(w t)  
のナイーブT細胞の活性化は、上記実施例8に記載の方法で行った。活性化  
後の同細胞の増殖をB r d U取りこみ法によって測定した(第11図(A))。  
B r d Uを48時間の最後の6時間に添加して細胞を標識し、これを  
Proliferation ELISA kit(商品名: Roche より購入)を用いる測定によって細胞  
20 増殖を決定した。また、この時のI F N- $\gamma$ 産生量をELISA Kit(商品名:  
Genzyme より購入)にて測定した(第12図(A))。

P D-1遺伝子ホモ欠損マウス(P D-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(w t)  
由来のT細胞を上記実施例8に記載の方法であらかじめ活性化させた。続い  
て、既に活性化しているT細胞に対して、野生型マウスからのマイトマイシ  
ンC処理L N P C sの存在あるいは非存在下で、さらに、30  $\mu$ g/ml抗  
25 P D-L 1抗体(1-1 1 1)(コントロールとしたラットI g G)、20

$\mu\text{g}/\text{ml}$  CTLA4-Ig (Genzyme) (コントロールとしたヒトIgG) の存在あるいは非存在下でそれぞれ60時間培養して、最後の12時間の同細胞の増殖をBrdU取りこみ法によって測定した(第11図(B))。また、48時間時点でのIFN- $\gamma$ 産生量も測定した(第12図(B))。

- 5      ナイーブT細胞の活性化時におけるIFN- $\gamma$ 産生量は、PD-1<sup>-/-</sup>と野生型マウスの違いによる有意な差異は認められなかった。一方、既に活性化されたT細胞においては、野生型マウス由来のT細胞のIFN- $\gamma$ 産生量は、PD-1<sup>-/-</sup>由来のものに比べ有意に低かった(第12図)。このことから、既に活性化しているT細胞に対するPD-1の抑制作用の効果は、ナイーブT
- 10    細胞の活性化に対する効果よりも高いことが示唆された。

- 野生型マウス由来の活性化したT細胞は、LNPCsとの共培養では、T細胞の細胞増殖およびIFN- $\gamma$ 産生量に有意な変化は認められないが、PD-1<sup>-/-</sup>由来の活性化したT細胞は、LNPCsとの共培養によって、その細胞増殖に有意な増加が認められた(第11図(B)、第12図(B))。また、野生型マウス由来の活性化したT細胞とLNPCsとの共培養への抗PD-L1抗体の添加によって、T細胞の細胞増殖の増加が認められた(第11図(B))。これらの結果は、LNPCsのPD-1あるいはPD-L1が、活性化T細胞の抑制に関与しており、PD-1の欠如あるいはPD-1とPD-L1間の相互作用の阻害が、T細胞を活性化することを示すもので
- 15    ある。
- 20    ある。

- PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)の活性化T細胞を、5  $\mu\text{M}$  CFSE(5-(6)-carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl diester) (商品名: Molecular probes より購入) で標識して、LNPCsとともに48時間共培養した。この時の細胞分裂を、FACSを用いたCFSE活性測定によって決定した(第12図(C))。
- 25    活性化T細胞の細胞増殖抑制は、細胞分裂の停止に起因しており、PD-

1 シグナルがT細胞の細胞分裂を抑制することが示唆された(第12図(C))。

#### 実施例10

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)  
5 (3匹/群)に10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup>PFU (plaque-forming units) Ad-lacZを静脈内投与して、マウスをアデノウイルスに感染させた。ここで使用したAd-lacZは、E1およびE3領域に欠損を有し、さらに、lacZ遺伝子を持った5型アデノウイルスであり、293細胞で増殖させた後、塩化セシウム密度勾配遠心分離  
10 (Nucleic Acid Research, 1995年, 第234巻, 第19号, p.3816~3821)の記載によって精製したものである。

感染後0日目あるいは7日目に、同マウスに対して屠殺1時間前に0.5mg BrdU (商品名: Sigmaより購入)を静脈内投与して、採取した脾臓細胞および肝臓内リンパ球を抗BrdU抗体および抗CD19抗体あるいは抗CD3抗体で二重標識した(第13図)。  
15 さらに、感染後7日目の同細胞に対しては、抗BrdU抗体、抗CD19抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体で二重標識した(第14図(B)、それぞれの棒グラフはBrdU陽性細胞の割合を示す。))。

アデノウイルス感染したPD-1<sup>-/-</sup>マウスの肝臓では、同様に感染した野生型マウスの肝臓に比較して、増殖性(BrdU陽性)の各リンパ球(CD19陽性、CD3陽性、CD4陽性、CD8陽性)の割合が増加していた。一方、このような現象が脾臓では認められなかったことから、PD-1は、炎症を起した組織でのT細胞の増殖を阻害することが示唆された(第14図(B))。

#### 25 実施例11

PD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)

(3匹/群)に $10^9$ - $10^{10}$ PFU Ad-lacZを静脈内投与して、マウスをアデノウイルスに感染させ、さらに、感染後0日目あるいは7日目の屠殺1時間前に0.5 mg BrdU (商品名: Sigma より購入)を静脈内投与して、採取した肝臓切片を抗BrdU抗体で標識した(第15図(a)~(d))、20倍拡大像)。感染後7日目のPD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)の肝臓切片に対しては、抗BrdU抗体および抗CD4抗体あるいは抗CD8抗体で二重標識した(第15図(e)、(f)、40倍拡大像)。

感染後30日目の野生型マウスの肝臓では、洞様毛細血管および非実質領域への中程度の局所的な細胞浸潤が認められたが、PD-1<sup>-/-</sup>マウスでは、肝炎を示す症状は認められなかった(第16図(h)、(i)および(j)、(n))。

感染後7日目あるいは30日目のPD-1遺伝子ホモ欠損マウス(PD-1<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(wt)の肝臓切片に対して、ヘマトキシリン&エオジン染色(第16図(g)~(j))、20倍拡大像、(k)~(n)、40倍拡大像)およびX-Gal染色を行った(第16図(o)~(r))、40倍拡大像)。

感染後7日目および30日目の野生型マウスの肝臓では、X-Gal染色像が示すアデノウイルスの感染が認められたが、PD-1<sup>-/-</sup>マウスでは、その感染は、30日目にはほぼ排除されていた(第16図(o)、(p)および(q)、(r))。これらの結果から、PD-1シグナルが、ウイルス感染による炎症組織におけるエフェクターT細胞の細胞増殖を誘導することによるウイルスの排除に関与することが示された。

## 実施例12

マウスPD-L1を強制発現させたP-815/PD-L1細胞は、5  $\mu$ g/mL puromycin (Sigma より購入)を含む通常培地(以下、選択培地と略

す。)を用いて、培養フラスコに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>/95%airの条件で50%~90%コンフルエントになるまで培養した。マウス cytotoxic T lymphocyte 2C 細胞は、MMC (Mitomycin C) 処理したP-815細胞およびConA刺激ラット脾細胞培養上清とともに通常培地中で数日継代培養した。

- 5 回収したP-815/PD-L1細胞に DELFIA EuTDA Cytotoxicity Reagents (PerkinElmer より購入)の BATDA Reagent を3μL加え、15分間培養した。さらに、PBSで洗浄した。2C細胞は、P-815細胞を加えて継代した5~8日目の細胞を用いた。

- 被検物質である抗マウスPD-1抗体(第17図中、anti-mPD-1Ab(J43))、
- 10 抗マウスPD-L1抗体(同図中、anti-mPD-L1Ab(1-111))、マウスPD-1Fc(同図中、mPD-1Fc)、ヒトPD-1Fc(同図中、hPD-1Fc)、マウスIgG2aκ(同図中、ControlIg)またはPBSを96well plateに20μL(10ng/mL)ずつ分注し、P-815/PD-L1細胞または通常培地を50μLずつ加えた。さらに2C細胞、通常培地
- 15 または1%TritonX100を含む通常培地を50μLずつ加えた。通常培地を添加したウェルの上清50μLをバックグラウンド用として回収し、その他の上清を回収するまで、37℃で保存した。残りの細胞は4時間培養した。続いて、同96well plateを遠心し、上清を回収した。回収した上清に Cytotoxicity Reagents (PerkinElmer より購入)の DELFIA Europium Solution を200μL添
- 20 加して15分間振とうした。振とう後、ARVOsx マルチラベルカウンター(WALLAC)にて時間分解蛍光測定を行った。なお、1%TritonX100を含む通常培地を添加したウェルの上清を高コントロール、通常培地を添加したウェルの上清を低コントロールとした。

- 評価群の組成は、被検物質、P-815/PD-L1細胞及び2C細胞、
- 25 高コントロール群の組成は、PBS、P-815/PD-L1細胞および1% TritonX100を含む通常培地、低コントロール群の組成は、PBS、P-815

- ／PD-L1細胞および通常培地、2C細胞コントロール群の組成は、PBS、通常培地および2C細胞、バックグラウンド群の組成は、PBS、P-815／PD-L1細胞及び通常培地である。CTL活性(%)は、以下の式にて算出した。すべての値は、バックグラウンドで得た平均値を引いたもの
- 5      を使用した。
- $$\text{CTL活性(\%)} = ([\text{評価群測定値}] - [\text{2C細胞コントロール群測定値}] - [\text{低コントロール群測定値}]) \div ([\text{高コントロール群測定値}] - [\text{低コントロール群測定値}]) \times 100$$
- 抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体およびPD-1Fcは、CTL活性を有意に増強した(第17図(a)～(d)、図中、E:Tratioは、2C細胞と
- 10      PD-L1／P815細胞の混合比を示す。)

### 実施例13

- B16メラノーマ細胞を脾臓に移入したC57BL/6マウスに、抗マウスPD-1モノクローナル抗体を2日おきに腹腔内に投与して、移入後18
- 15      日目の肝臓重量を測定することによって、癌転移に対する抗PD-1抗体の抑制効果を評価した。

- コントロールIgGのみを投与したコントロール群に比べ、抗PD-1抗体投与群では、肝臓重量増加が有意に抑制された(肝臓重量／癌細胞非移入群:1.3g、コントロール群:6.8gから抗PD-1抗体投与群:3.5gへ減少)。
- 20      この重量増加の抑制は、B16メラノーマ細胞の転移を抑制することを示すものである。

## 請 求 の 範 囲

1. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を含有してなる免疫賦活組成物。  
5
2. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を含有してなる癌治療組成物。  
10
3. 癌転移を抑制する組成物である請求の範囲2記載の癌治療組成物。  
15
4. PD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質を含有してなる感染症治療組成物。  
20
5. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする請求の範囲2または3記載の癌治療組成物。  
25
6. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする請求の範囲4記載の感染症治療組成物。  
30
7. PD-1とPD-L1若しくはPD-1とPD-L2の相互作用阻害物質、PD-1の細胞内シグナル阻害物質、およびPD-1、PD-L1若しくはPD-L2の産生阻害物質から選択される一以上の免疫抑制シグナル阻害物質である請求の範囲1乃至6のいずれかに記載の組成物。  
35
8. PD-1抗体、PD-L1抗体、可溶化PD-1、および可溶化PD-L1から選択される一以上のPD-1とPD-L1の相互作用阻害物質で



ある請求の範囲 7 記載の組成物。

9. 国際受託番号 FERM BP-8392 で識別されるハイブリドーマが産生する抗ヒト PD-1 抗体、非ヒト抗体をヒト化させた抗 PD-1 抗体、および完全ヒト型抗ヒト PD-1 抗体から選択される PD-1 抗体である請求の範囲 8 記載の組成物。

10. 遺伝子改変により PD-1 発現が阻害されたリンパ球細胞が、免疫抑制シグナル阻害物質である請求の範囲 1 乃至 6 のいずれかに記載の組成物。

10

11. PD-1 と PD-L 1 若しくは PD-1 と PD-L 2 の相互作用阻害物質、PD-1 の細胞内シグナル阻害物質、または PD-1、PD-L 1 若しくは PD-L 2 の産生阻害物質が、タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、ポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、抗体若しくはそれらの誘導体、有機合成化合物、無機化合物、および天然物から選択される一以上の物質である請求の範囲 7 記載の組成物。

15

12. PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質を投与することからなる免疫賦活方法。

20

13. PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害物質を投与することからなる癌治療方法。

14. 癌転移を抑制する請求の範囲 13 記載の癌治療方法。

25

15. PD-1、PD-L 1、または PD-L 2 の免疫抑制シグナル阻害

物質を投与することからなる感染症治療方法。

16. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする請求の範囲13または14記載の癌治療方法。

5

17. 免疫賦活を介して作用することを特徴とする請求の範囲15記載の感染症治療方法。

18. PD-1とPD-L1若しくはPD-1とPD-L2の相互作用阻  
10 害物質、PD-1の細胞内シグナル阻害物質、およびPD-1、PD-L1  
若しくはPD-L2の産生阻害物質から選択される一以上の免疫抑制シグナル  
阻害物質である請求の範囲12乃至17のいずれかに記載の方法。

19. PD-1抗体、PD-L1抗体、可溶化PD-1、および可溶化P  
15 D-L1から選択される一以上のPD-1とPD-L1の相互作用阻害物質  
である請求の範囲18記載の方法。

20. 国際受託番号 FERM BP-8392 で識別されるハイブリドーマが産生す  
る抗ヒトPD-1抗体、非ヒト抗体をヒト化させたPD-1抗体、および完  
20 全ヒト型抗ヒトPD-1抗体から選択されるPD-1抗体である請求の範囲  
19記載の方法。

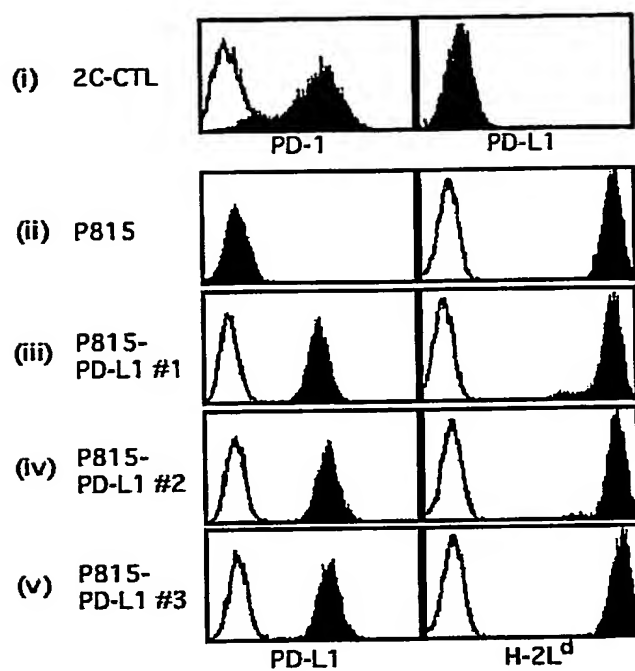
21. 遺伝子改変によりPD-1発現が阻害されたリンパ球細胞が、免疫  
抑制シグナル阻害物質である請求の範囲12乃至17のいずれかに記載の方  
25 法。

22. PD-1とPD-L1若しくはPD-1とPD-L2の相互作用阻害物質、PD-1の細胞内シグナル阻害物質、またはPD-1、PD-L1若しくはPD-L2の産生阻害物質が、タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチド、ポリヌクレオチド若しくはポリヌクレオシド、抗体若しくはそれらの誘導体、有機合成化合物、無機化合物、および天然物から選択される1つ以上の物質である請求の範囲18記載の方法。
23. 免疫賦活組成物を製造するためのPD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質の使用。
24. 癌治療組成物を製造するためのPD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質の使用。
25. 癌治療組成物が、癌転移抑制組成物である請求の範囲24記載の物質の使用。
26. 感染症治療組成物を製造するためのPD-1、PD-L1、またはPD-L2の免疫抑制シグナル阻害物質の使用。
27. PD-L1またはPD-L2を発現するように形質転換されたスクリーニング用癌細胞株。
28. 請求の範囲27記載の細胞、リンパ球細胞および被験物質を接触させて、請求の範囲27記載の細胞へのリンパ球細胞の免疫反応に対する被験物質の増強作用を評価することを特徴とする免疫賦活物質のスクリーニング方法。

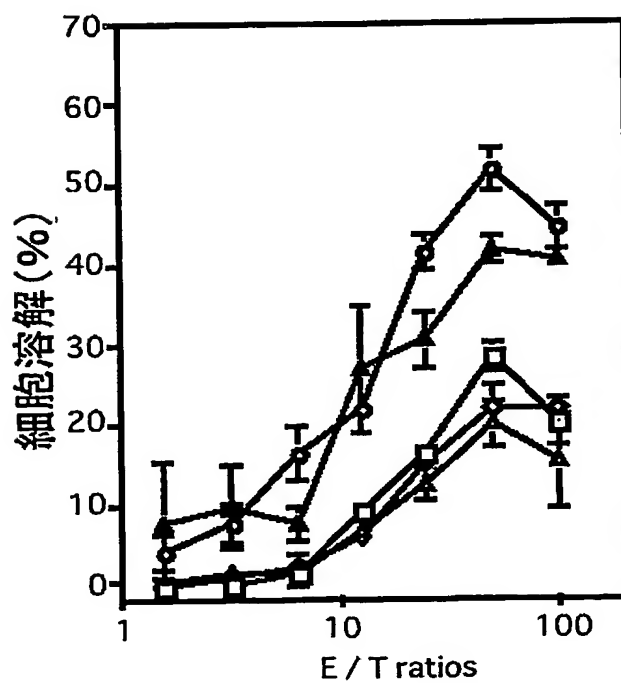
29. 癌細胞である請求の範囲27記載の細胞、リンパ球細胞および被験物質を接触させて、その癌細胞へのリンパ球細胞の免疫反応に対する被験物質の増強作用またはその腫瘍細胞の増殖に対する阻害作用を評価することを
- 5 特徴とする癌治療物質のスクリーニング方法。
30. 病原体を感染させた請求の範囲27記載の細胞またはPD-L1若しくはPD-L2を発現する細胞、リンパ球細胞および被験物質を接触させて、その感染細胞へのリンパ球細胞の免疫反応に対する被験物質の増強作用
- 10 または病原体増殖に対する阻害作用を評価することを特徴とする感染症治療物質のスクリーニング方法。
31. 請求の範囲27記載の癌細胞株を移植して作出した哺乳動物。
- 15 32. 請求の範囲31記載の哺乳動物に被験物質を投与し、被験物質による移植癌細胞の増殖に対する抑制率またはその被移植哺乳動物の生存率を評価することを特徴とする癌治療物質の選別方法。

第 1 図

(A)

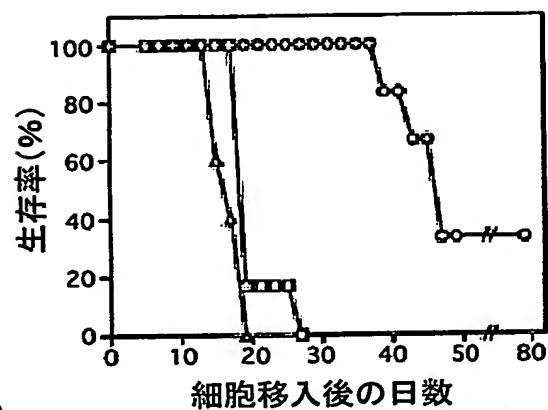
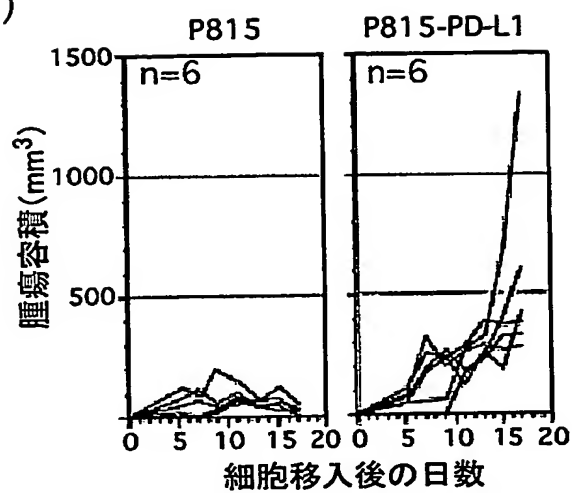


(B)

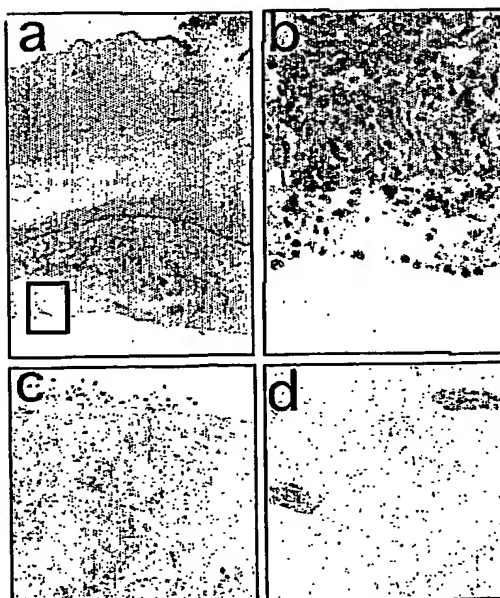


第2図

(A)

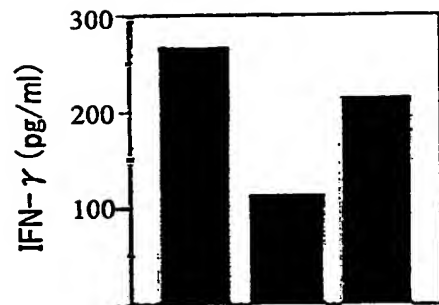


(B)



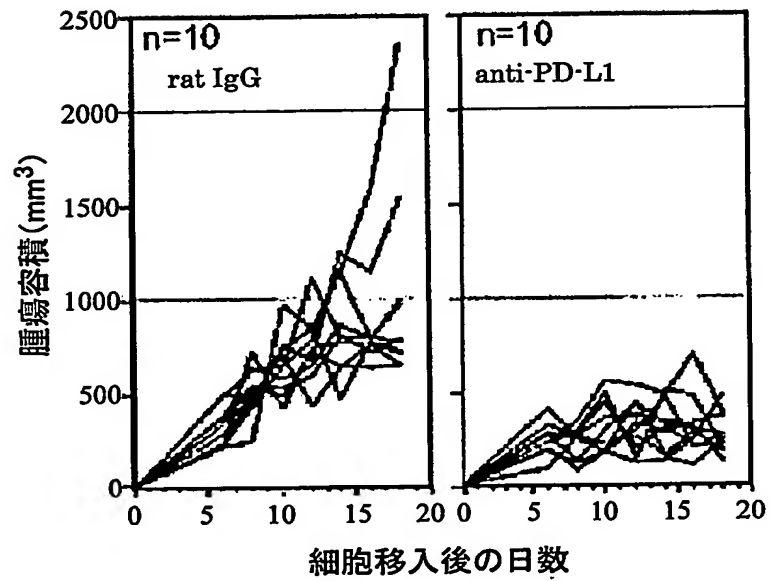
第3図

(A)

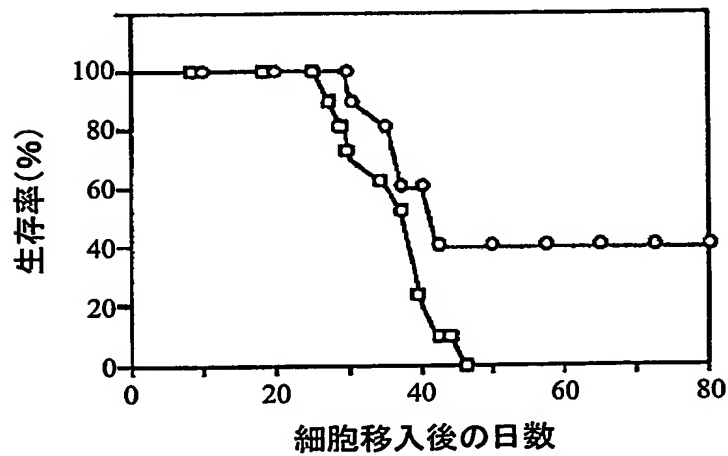


P815 P815-PD-L1 P815-PD-L1+  
anti-PD-L1

(B)

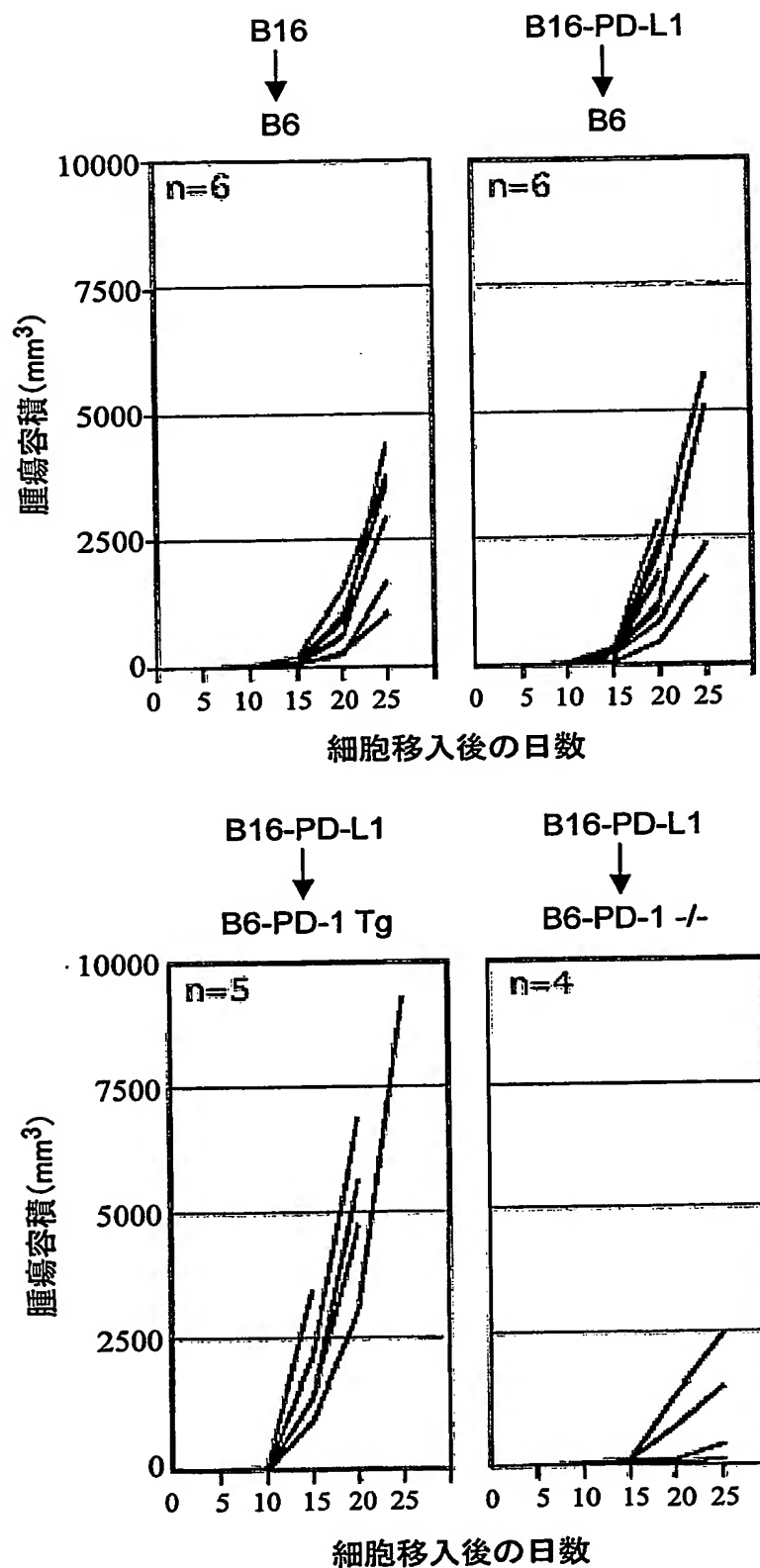


細胞移入後の日数



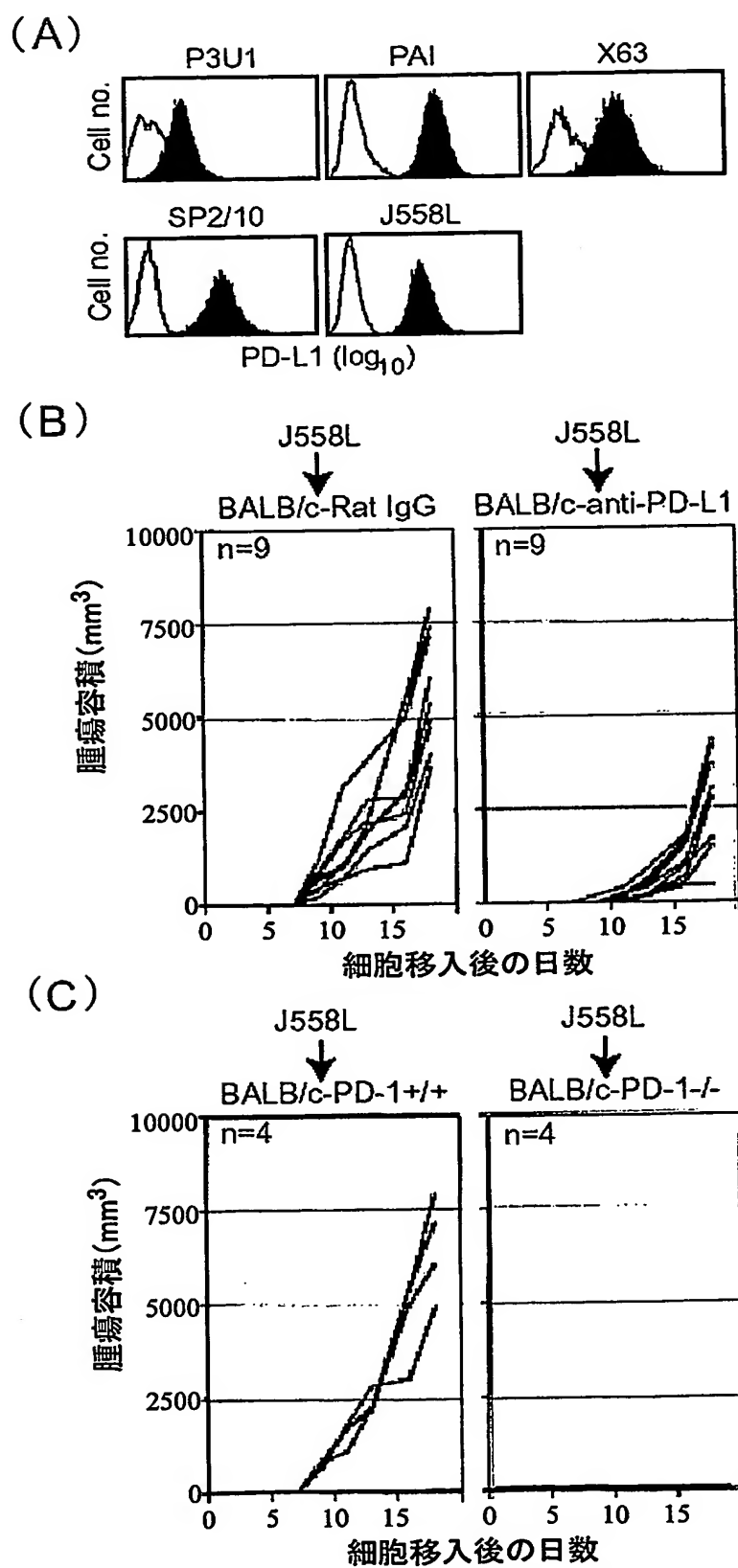
細胞移入後の日数

第4図



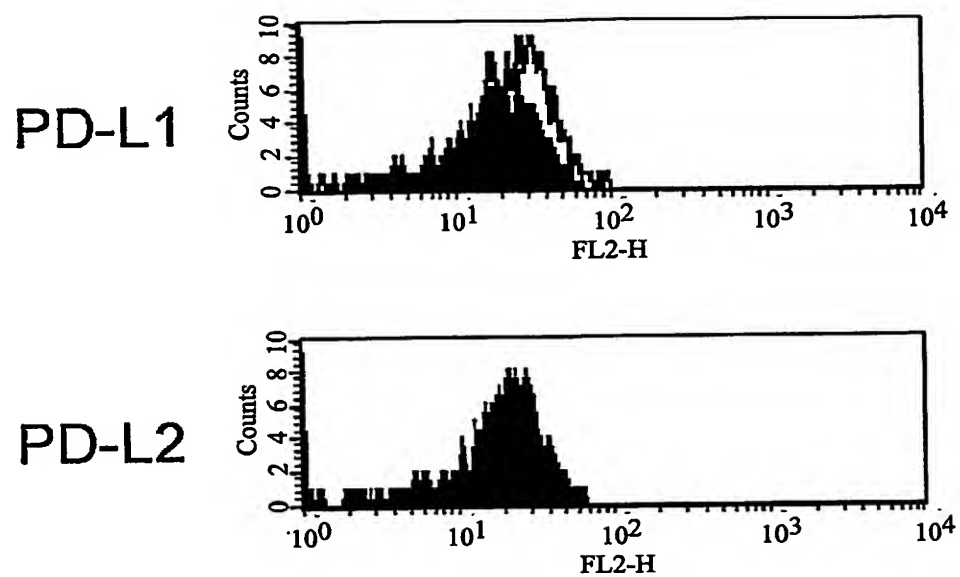


第5図

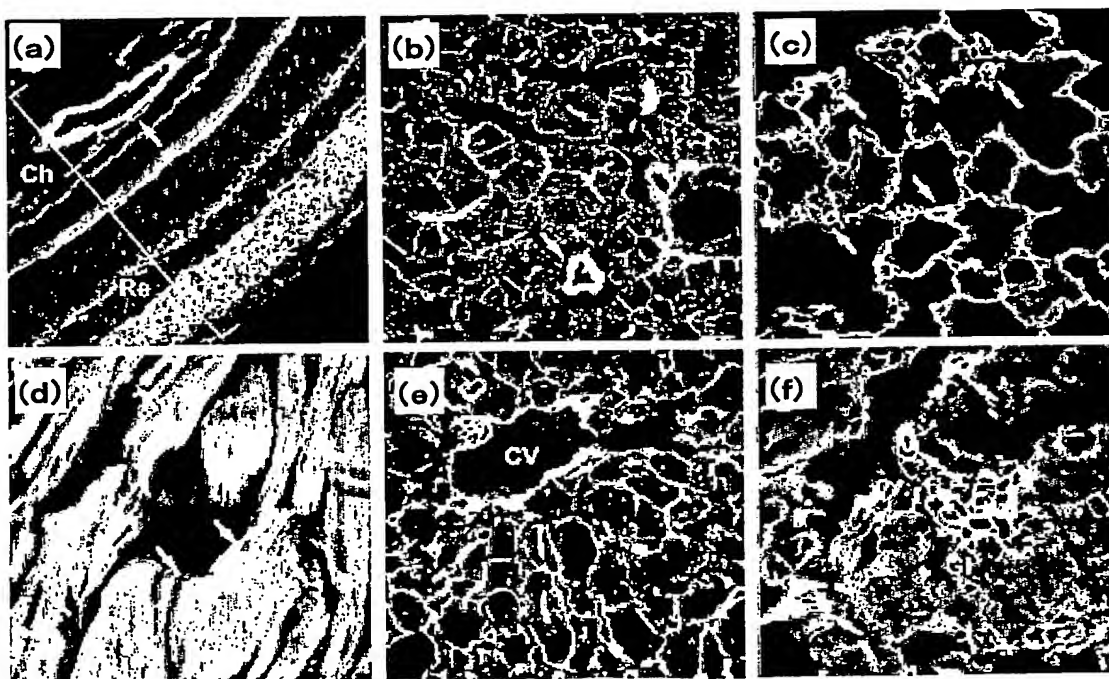


第6図

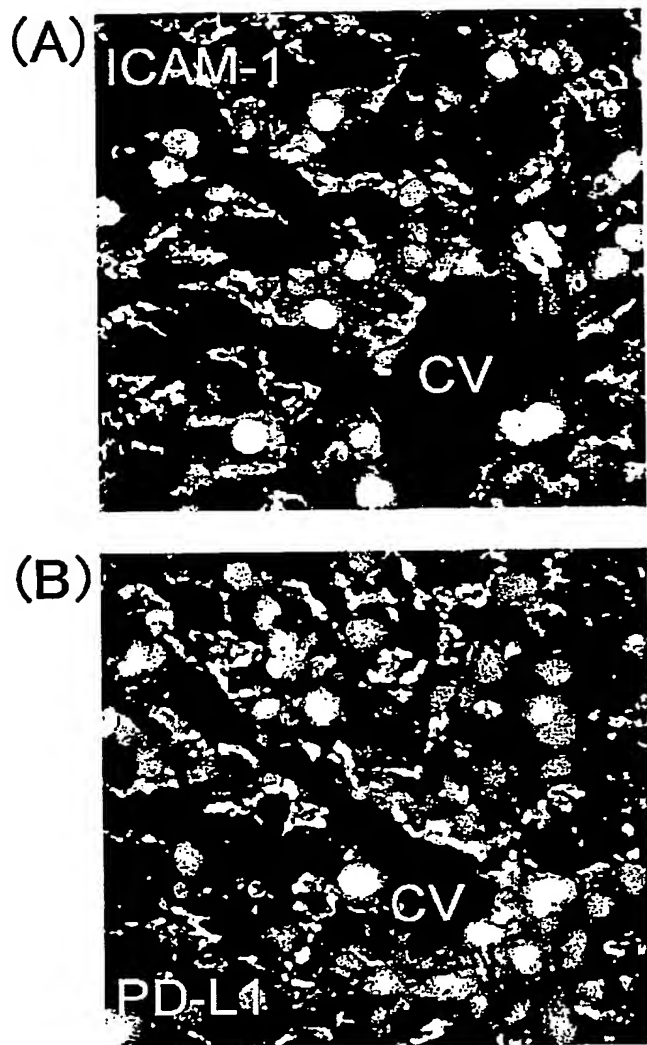
(A)



(B)

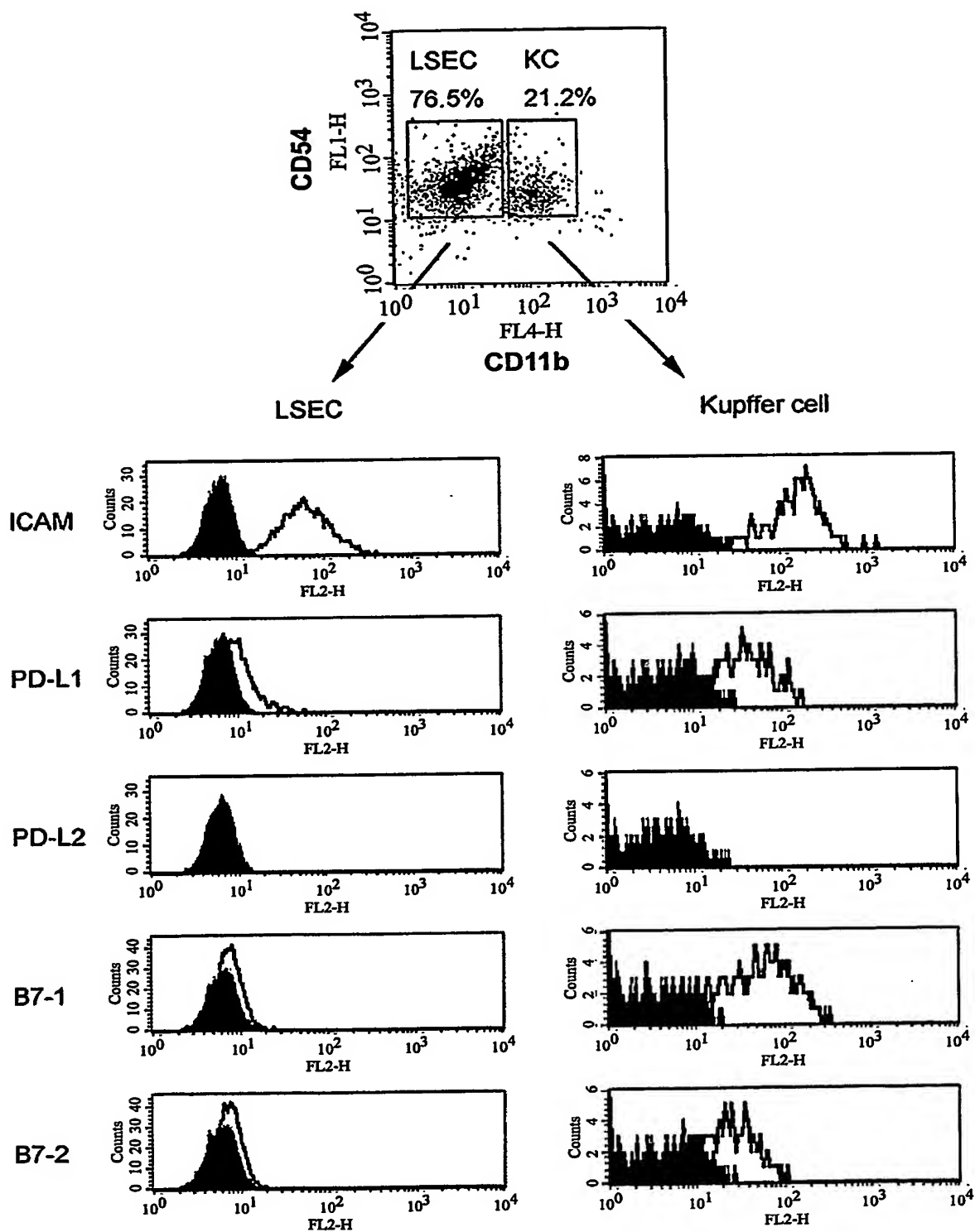


第7図



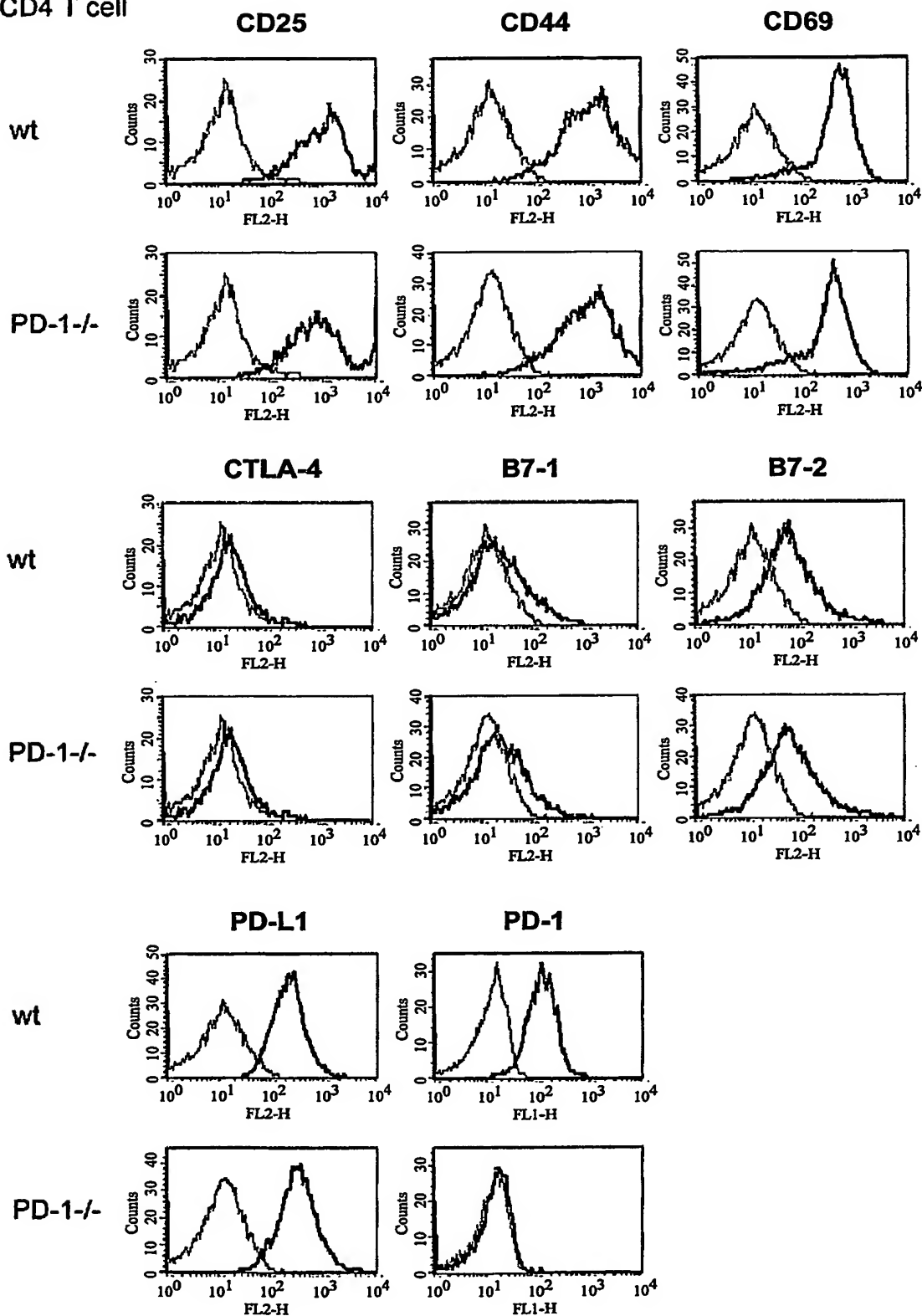
x40

第 8 図



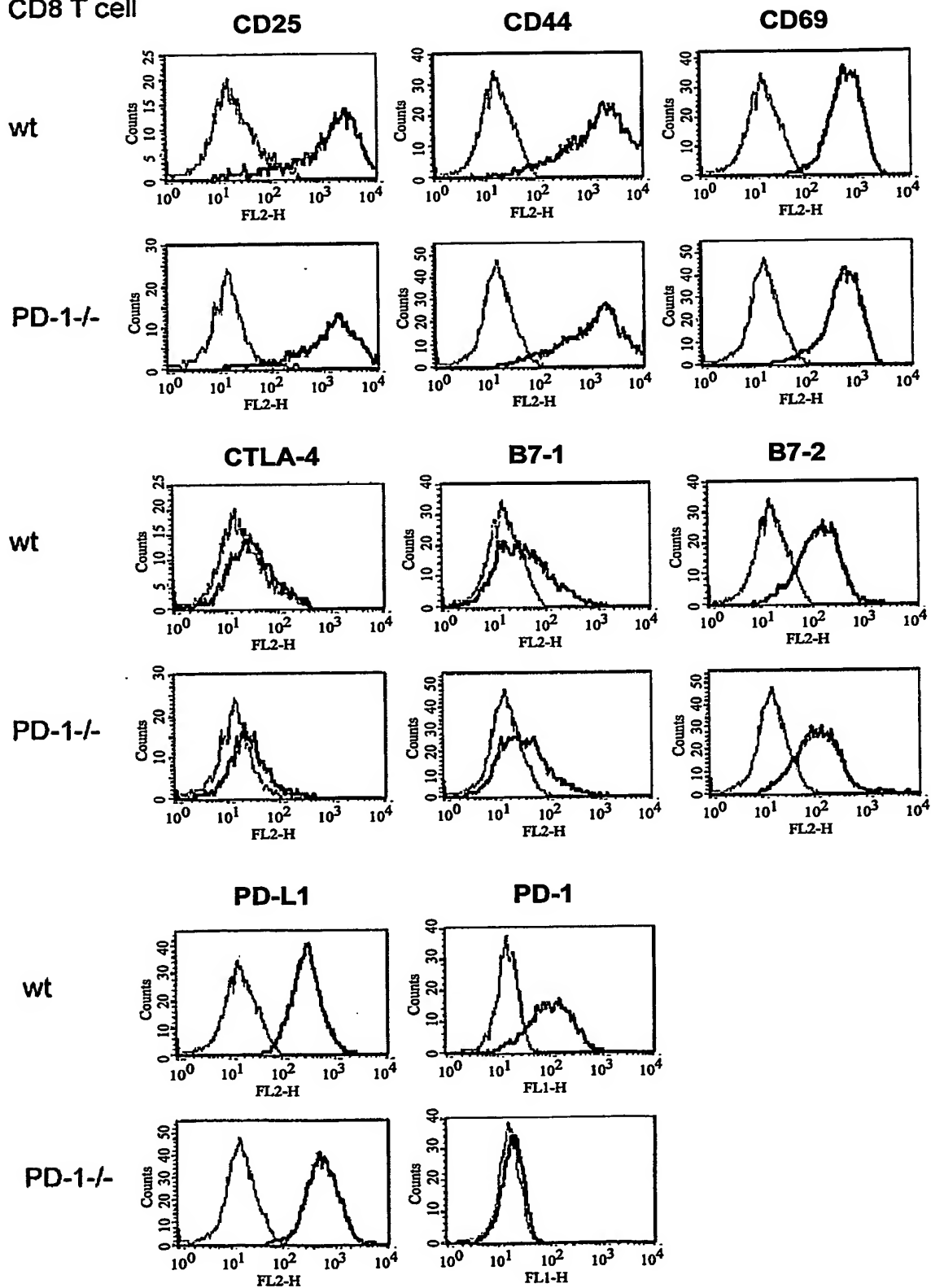
第9図

CD4 T cell



## 第 10 図

CD8 T cell

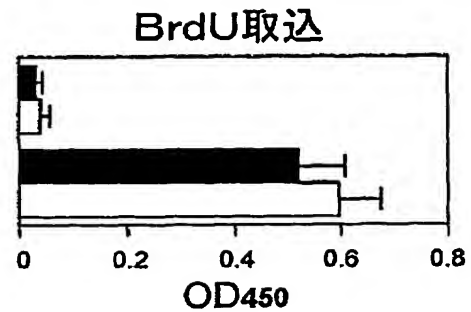


第 1 1 図

(A)

naive wtT  
naive PD-1<sup>-/-</sup>T

naive wtT +  $\alpha$ -CD3  
naive PD-1<sup>-/-</sup>T +  $\alpha$ -CD3



(B)

LNPC  
activated wtT  
activated PD-1<sup>-/-</sup>T

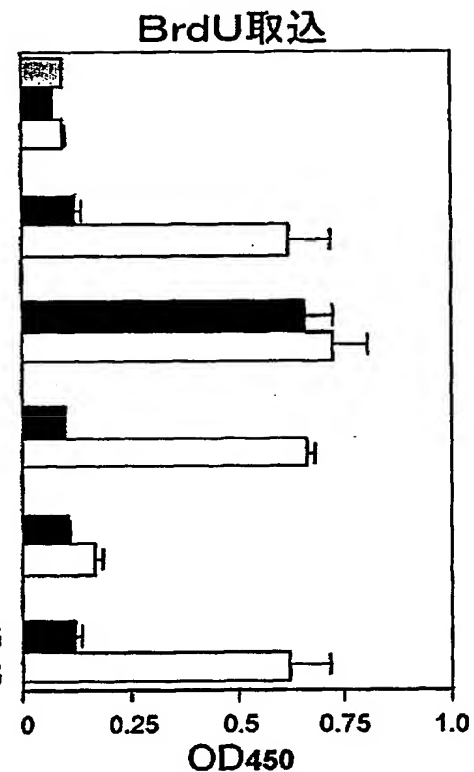
LNPC+activated wtT  
LNPC+activated PD-1<sup>-/-</sup>T

LNPC+activated wtT +  $\alpha$ -PD-L1  
LNPC+activated PD-1<sup>-/-</sup>T +  $\alpha$ -PD-L1

LNPC+activated wtT + rat IgG  
LNPC+activated PD-1<sup>-/-</sup>T + rat IgG

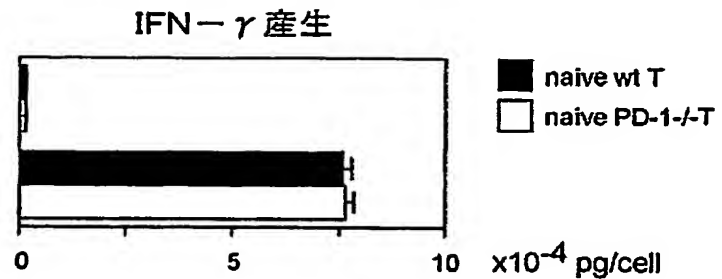
LNPC+activated wtT + CTLA4Ig  
LNPC+activated PD-1<sup>-/-</sup>T + CTLA4Ig

LNPC+activated wtT + human IgG  
LNPC+activated PD-1<sup>-/-</sup>T + human IgG

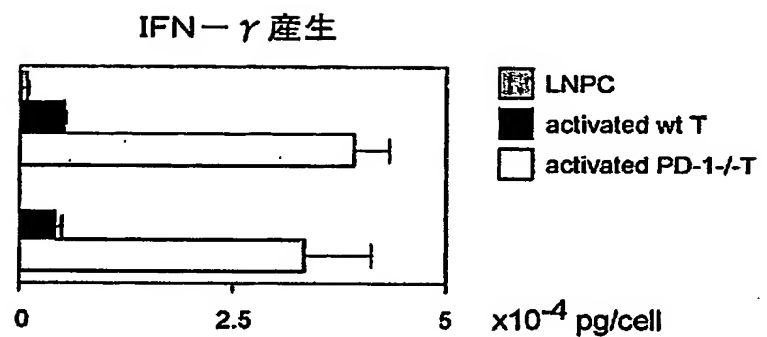


## 第 1 2 図

(A)

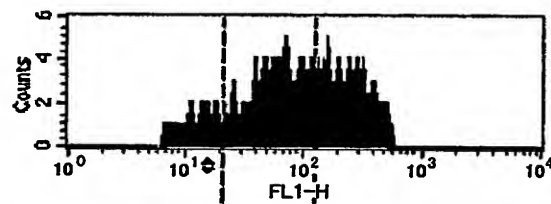
naive wtT  
naive PD-1-/-Tnaive wtT +  $\alpha$ -CD3  
naive PD-1-/-T +  $\alpha$ -CD3

(B)

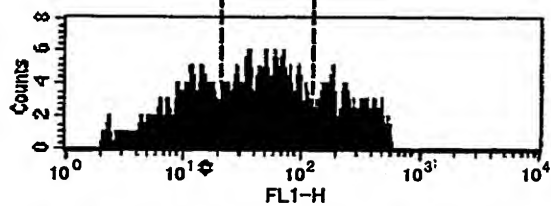
LNPC  
activated wtT  
activated PD-1-/-TLNPC+activated wtT  
LNPC+activated PD-1-/-T

(C)

LNPC+activated wtT



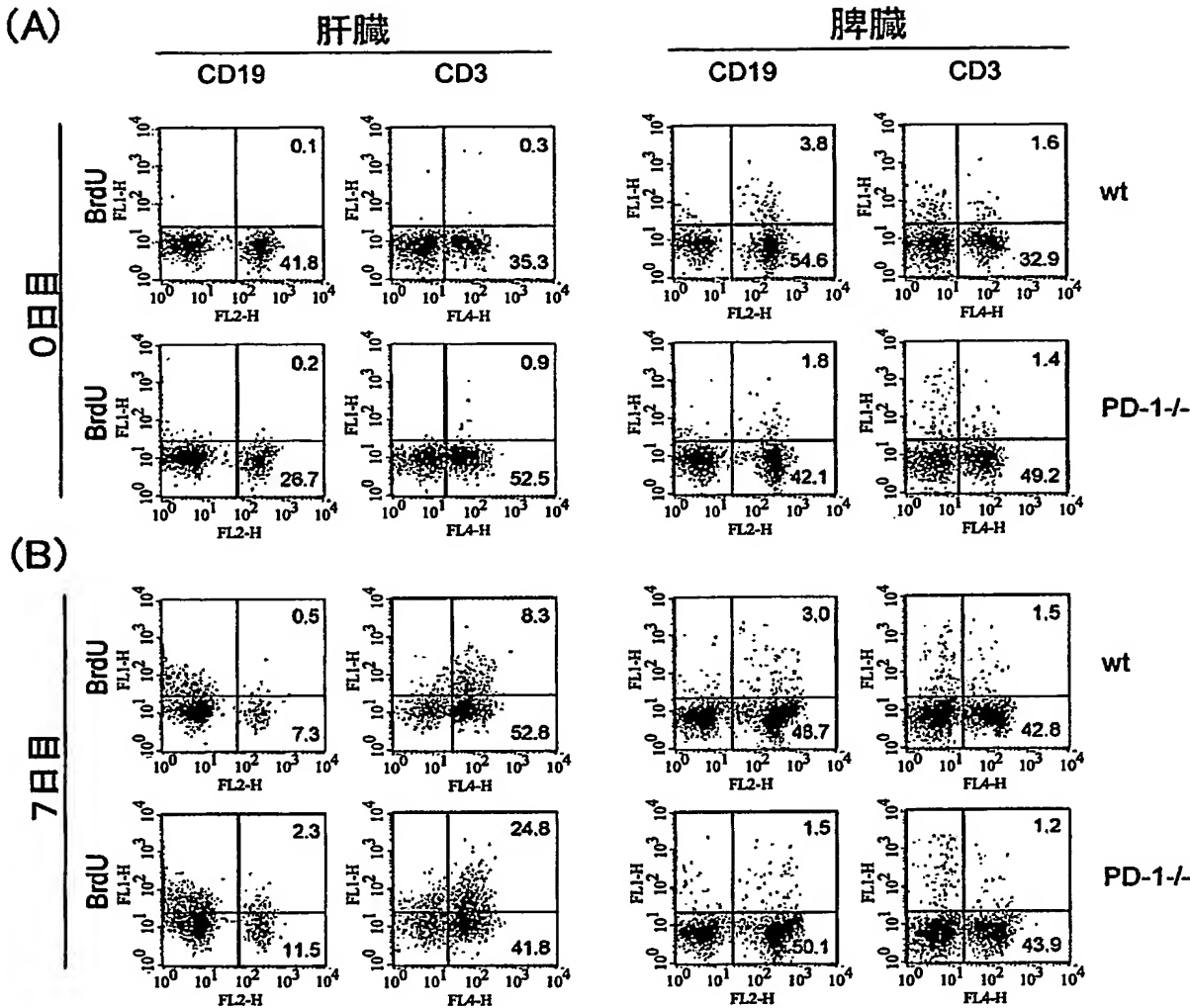
LNPC+activated PD-1-/-T



CFSE



第 1 3 図



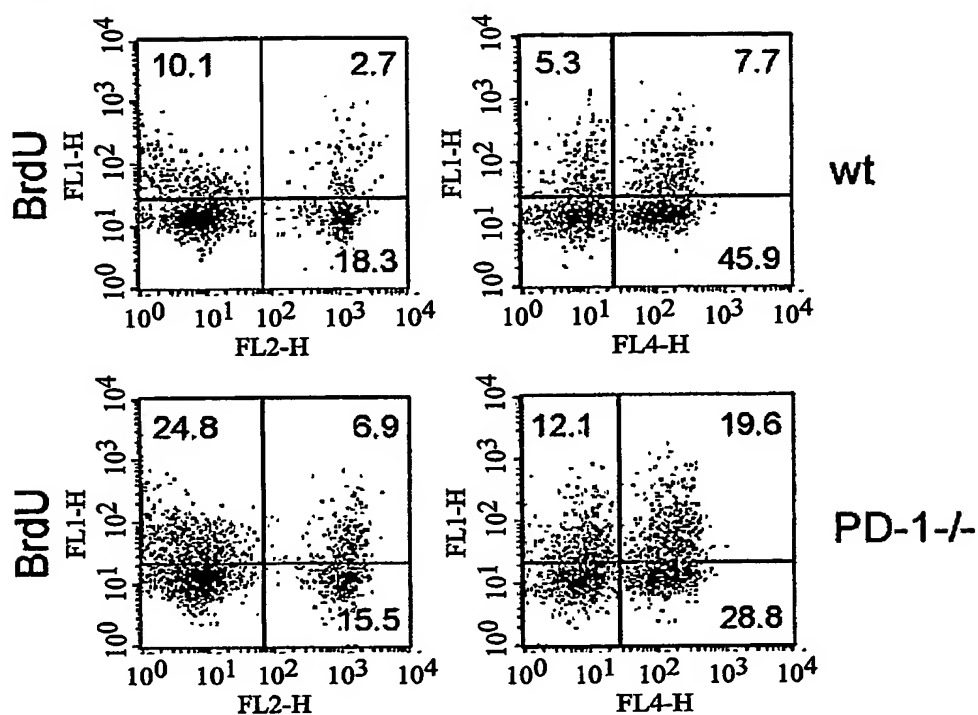
第14図

## (A) 肝臓

7日目

CD4

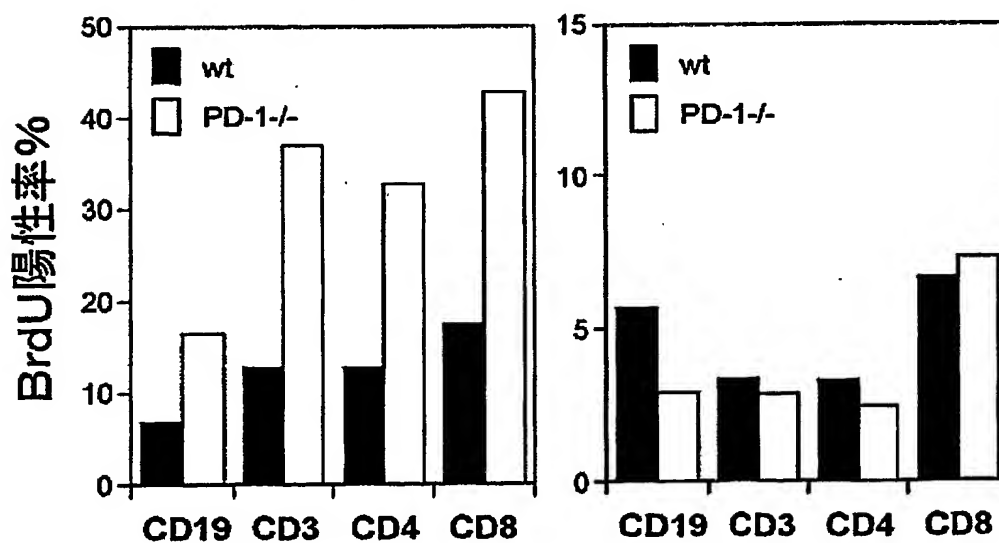
CD8



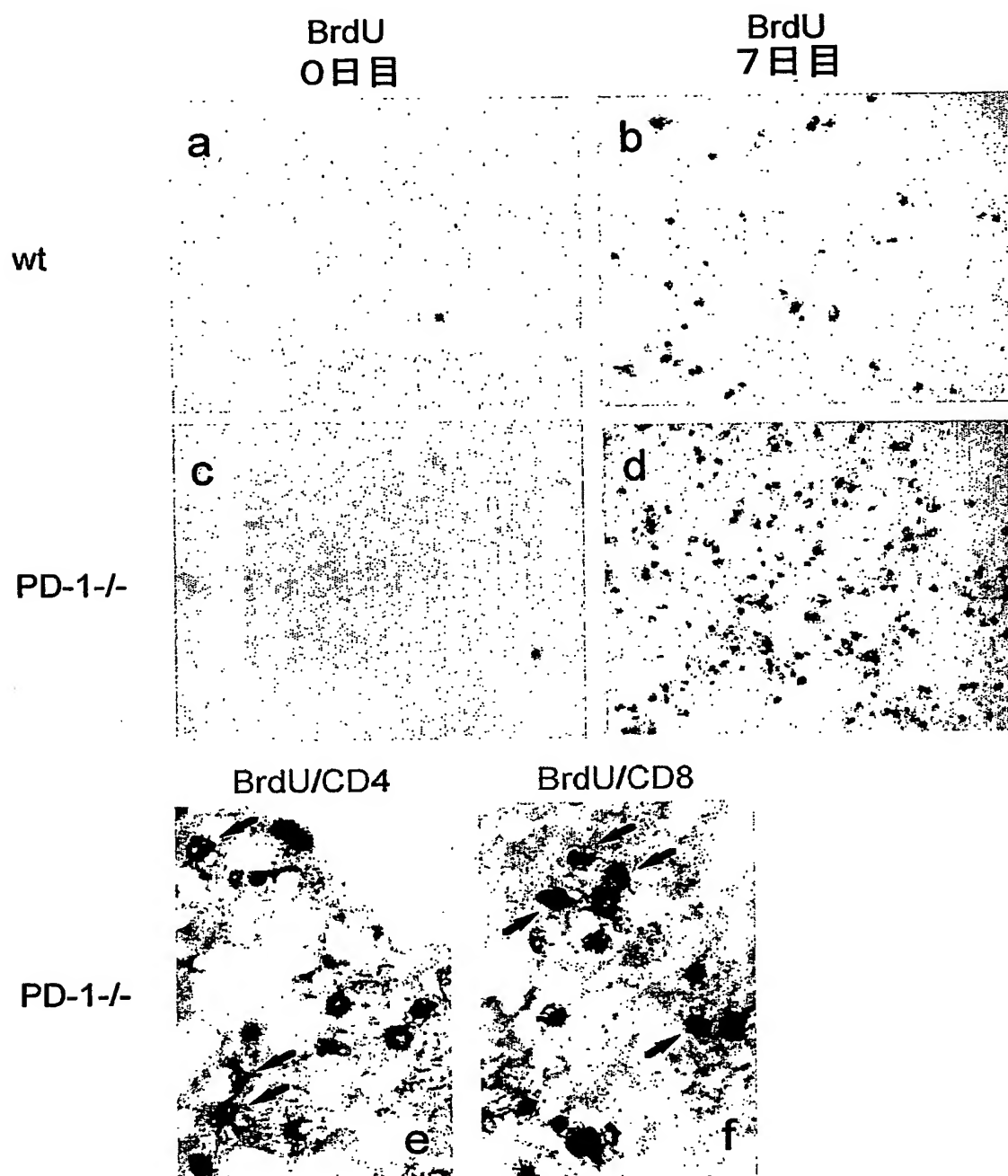
## (B)

肝臓

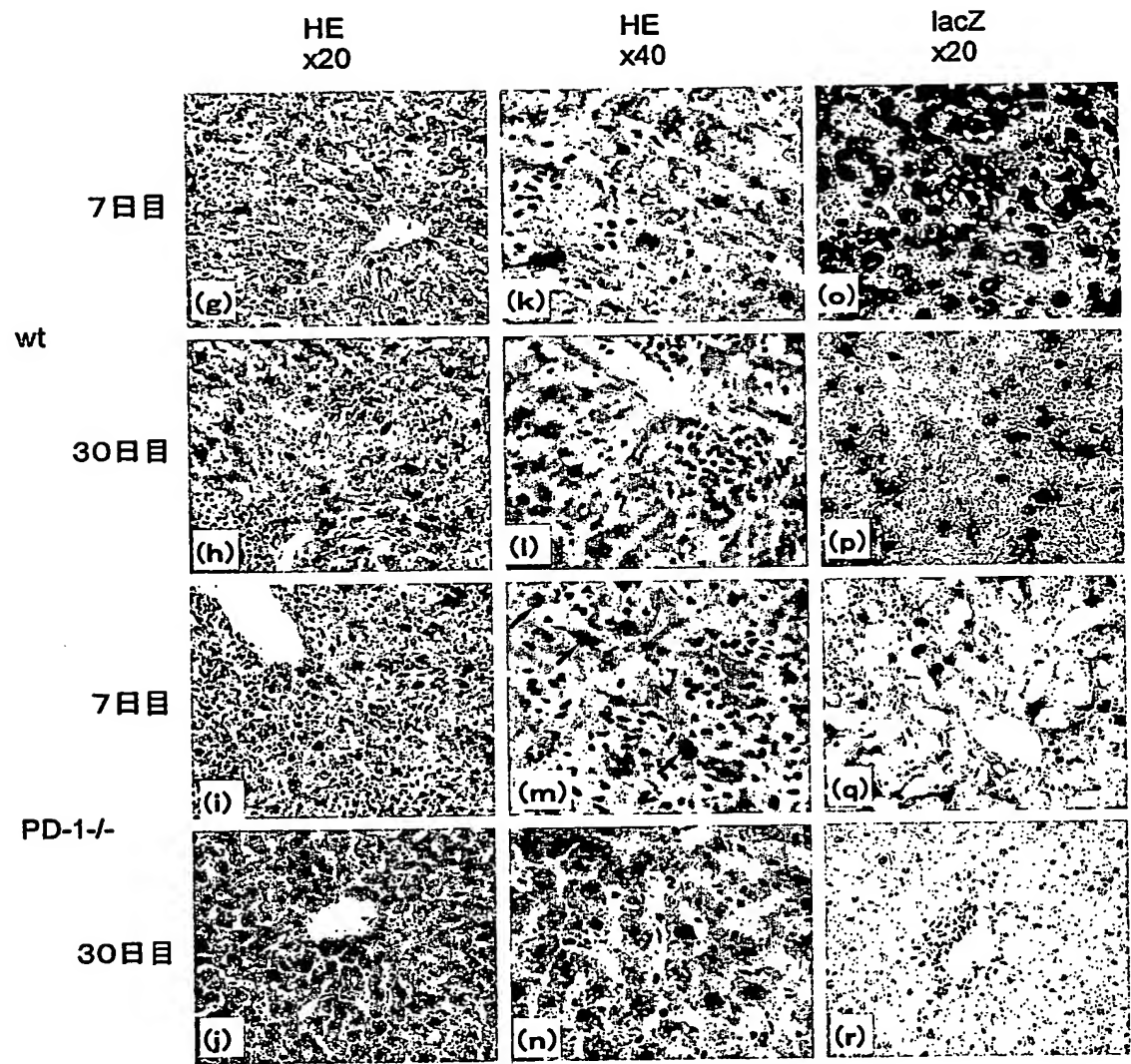
脾臓



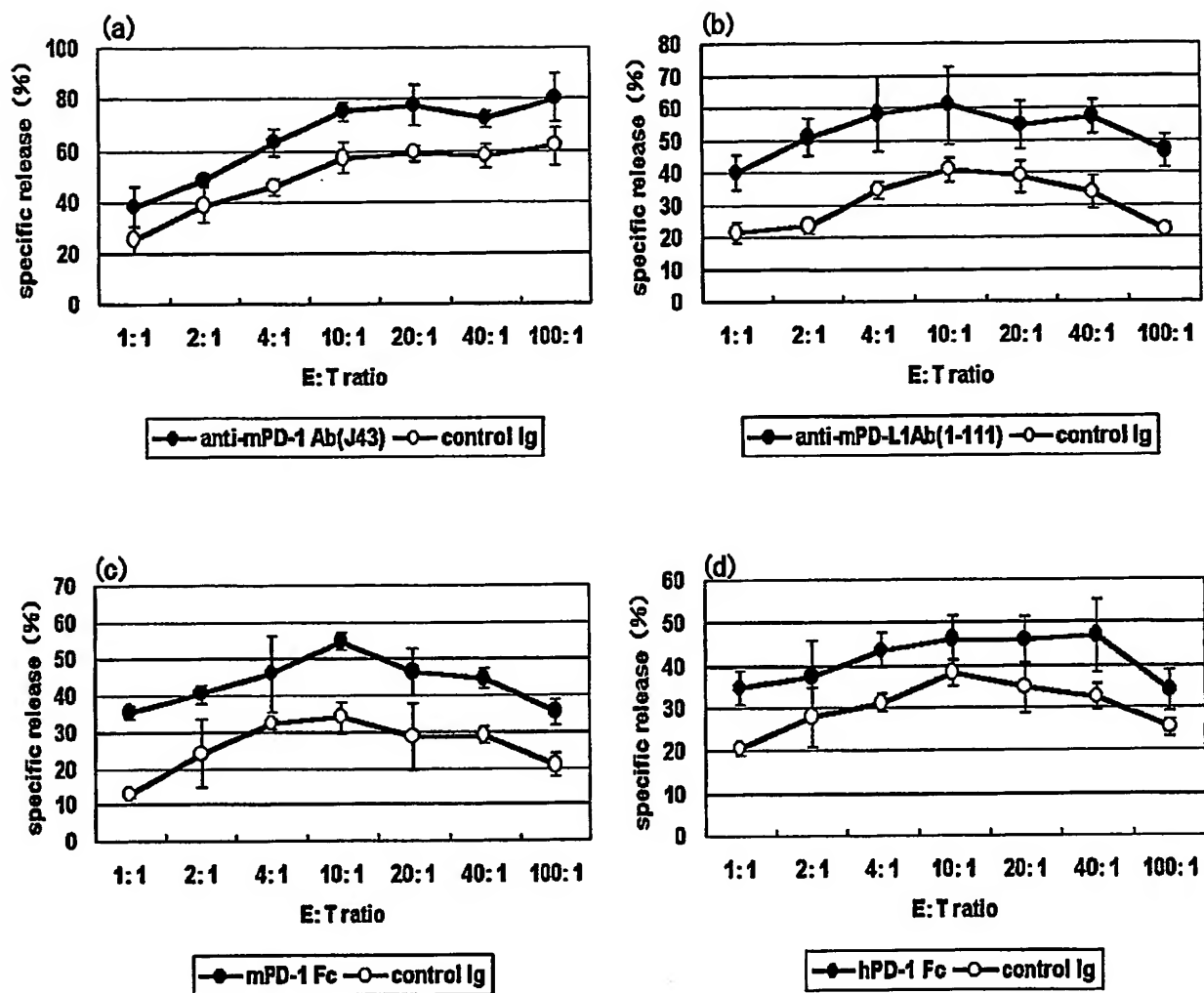
第15図



第 1 6 図



第 17 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08420

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/7088, A61P31/00, 35/00,  
35/04, 37/04, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50, A01K6//027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, 38/17, 39/395, 31/7088, A61P31/00, 35/00,  
35/04, 37/04, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50, A01K6//027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/14557 A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.), 01 March, 2001 (01.03.01), Particularly, abstract; Claims; page 82, line 8 to page 86, line 10 & EP 1210428 A1 & US 2002/102651 A1 & US 2002/160000 A1 & BR 2000013581 A & NO 2002000859 A	1-11, 23-33
X	WO 02/00730 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 03 January, 2002 (03.01.02), Particularly, abstract; Claims; page 104, line 9 to page 108, line 13 & WO 02/00730 A3 & WO 02/00730 C2 & EP 1297135 A2 & US 2002/110836 A1 & US 2002/164600 A1 & AU 2001071731 A5	1-11, 23-33

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
04 October, 2003 (04.10.03)

Date of mailing of the international search report  
21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08420

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/00692 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.), 03 January, 2002 (03.01.02), Particularly, abstract; Claims; page 104, line 9 to page 108, line 13 & WO 02/00692 A3 & WO 02/00692 C2 & EP 1320599 A2 & US 2002/110836 A1 & US 2002/164600 A1	1-11,23-33
X	EP 670369 A2 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 06 September, 1995 (06.09.95), Particularly, abstract; Claims; page 5, line 52 to page 6, line 6 & EP 670369 A3 & US 5629204 A & US 5698520 A & JP 7-291996 A & JP 2003-230395 A & CA 2143491 A & CN 1113518 A & CN 1080311 B	1-11,23-33
X	BROWN, Julia A. et al., Blockade of PD-1 Ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production., FASEB Journal, March 2002, Vol.16, No.4, pp.A710,517.4	1-11,23-33
P,X	WO 03/042402 A2 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.), 22 May, 2003 (22.05.03), Particularly, abstract; Claims; page 56 line 21 to page 59, line 2 (Family: none)	1-11,23-33
P,X	WO 03/011911 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 13 February, 2003 (13.02.03), Particularly, abstract; Claims; page 14, lines 17 to 19 (Family: none)	1-11,23-33
P,X	WO 02/078731 A1 (WYETH), 10 October, 2002 (10.10.02), Particularly, abstract; Claims; page 74, line 27 to page 77, line 29 (Family: none)	1-11,23-33
P,X	BROWN, Julia A. et al., Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production., The Journal of Immunology., February 2003, Vol.170, No.3, 1257-66	1-11,23-33

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08420

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12-22

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12-22 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K 45/00, 38/17, 39/395, 31/7088, A61P31/00, 35/00, 35/04, 37/04, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50, A01K6//027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A61K 45/00, 38/17, 39/395, 31/7088, A61P31/00, 35/00, 35/04, 37/04, C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/50, A01K6//027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), JICST(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/14557 A1(DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 2001.03.01 特に、Abstract, Claims, 第82 <sup>ページ</sup> -ジ 第8行-第86 <sup>ページ</sup> -ジ 第10行 & EP 1210428 A1 & US 2002/102651 A1 & US 2002/160000 A1 & BR 2000013581 A & NO 2002000859 A	1-11, 23-33

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.10.03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝原下

浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/00730 A2(GENETICS INSTITUTE, INC.)2002.01.03 特に、Abstract, Claims, 第104 <sup>ページ</sup> -第9行-第108 <sup>ページ</sup> -第13行 & WO 02/00730 A3 & WO 02/00730 C2 & EP 1297135 A2 & US 2002/110836 A1 & US 2002/164600 A1 & AU 2001071731 A5	1-11, 23-33
X	WO 02/00692 A2(GENETICS INSTITUTE, INC.)2002.01.03 特に、Abstract, Claims, 第104 <sup>ページ</sup> -第9行-第108 <sup>ページ</sup> -第13行 & WO 02/00692 A3 & WO 02/00692 C2 & EP 1320599 A2 & US 2002/110836 A1 & US 2002/164600 A1	1-11, 23-33
X	EP 670369 A2(ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)1995.09.06 特に、Abstract, Claims, 第5 <sup>ページ</sup> -第52行-第6 <sup>ページ</sup> -第6行 & EP 670369 A3 & US 5629204 A & US 5698520 A & JP 7-291996 A & JP 2003-230395 A & CA 2143491 A & CN 1113518 A & CN 1080311 B	1-11, 23-33
X	BROWN, Julia A. et al, Blockade of PD-1 Ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production., FASEB Journal, Mar. 2002, Vol.16, No.4, pp. A710, 517.4	1-11, 23-33
P X	WO 03/042402 A2(DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.) 2003.05.22 特に、Abstract, Claims, 第56 <sup>ページ</sup> -第21行-第59 <sup>ページ</sup> -第2行 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
P X	WO 03/011911 A1(小野薬品工業株式会社)2003.02.13 特に、Abstract, 請求の範囲, 第14 <sup>ページ</sup> -第17-19行 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
P X	WO 02/078731 A1(WYETH)2002.10.10 特に、Abstract, Claims, 第74 <sup>ページ</sup> -第27行-第77 <sup>ページ</sup> -第29行 (ファミリーなし)	1-11, 23-33
P X	BROWN, Julia A. et al, Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production., The Journal of Immunology. Feb. 2003, Vol.170, No.3, 1257-66	1-11, 23-33

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 12-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲12-22は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。